

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Comparação da sensibilidade da técnica parasitológica (OPG) e da PCR para o diagnóstico de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis infectados experimentalmente.

Gabriel Capella Machado

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Regina Vendrame Amarante

Botucatu

2008

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Comparação da sensibilidade da técnica parasitológica (OPG) e da PCR para o diagnóstico de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis infectados experimentalmente.

Gabriel Capella Machado

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Regina Vendrame Amarante

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – IBB – UNESP, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Machado, Gabriel Capella.

Comparação da sensibilidade da técnica parasitológica (OPG) e da PCR para o diagnóstico de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis infectados experimentalmente / Gabriel Capella Machado. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Mônica Regina Vendrame Amarate

1. Parasitologia médica 2. Biologia molecular

Palavras-chave: Infecção experimental; OPG; PCR; *Rattus norvegicus*; *Strongyloides venezuelensis*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Suzete e Aguinaldo**, meus maiores exemplos e meu porto seguro. A eles eu devo toda minha admiração e meu amor, minha criação, meu caráter e meus estudos.

Enfim, a eles devo tudo que sou hoje e é por isso que eu lhes dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Marianna**, minha namorada, por seu amor que me torna uma pessoa melhor a cada dia, por ser minha grande incentivadora e por ter estado ao meu lado sempre que precisei nesses nossos primeiros um ano e meio juntos. Agradeço-lhe por ter aparecido em minha vida, e por ser hoje a razão de tudo que eu faço.

À minha orientadora **Profª Drª Mônica Regina Vendrame Amarante**, por sua dedicação neste trabalho e por todos os valiosos ensinamentos. Sou muito grato pela oportunidade de ter trabalhado em um projeto que tanto gostei.

Ao **Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante** pela valiosa ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório **Nelson Mendes Marra** e **Samir Moura Kadri** por toda ajuda e aprendizado durante meu período de estágio e pelos momentos de descontração que permitiram que o convívio no laboratório fosse o melhor possível.

Aos demais componentes de nossa equipe de pesquisa, **Profª Drª Alexandrina Sartori**, **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior**, **Fernanda Chiuso Minicucci** e **Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella** por possibilitarem a realização desta monografia.

Ao **Victor**, meu irmão e meu primeiro amigo. Com ele sei que poderei contar sempre que eu precisar. Obrigado por esses 19 anos de união e amizade.

Aos meus avós **José** e **Mavil**, **Aguinaldo** e **Thereza**. À minha tia **Sirlene**, aos meus tios **Zé** e **Beto**, e a minha tia-avó **Nair**. Por terem sido minha base, ajudado a me criar e por me fazerem sentir muito amado desde sempre.

Aos irmãos que eu escolhi **Tops**, **Tau**, **Diz** e **Jumbo**, por todos nossos momentos inesquecíveis e por serem muito mais do que amigos. Conhecer essas pessoas já foi o suficiente para fazer valer a pena minha vinda a Botucatu. Nossos quatro anos de faculdade terminam aqui, mas nossa amizade é para a vida inteira.

Aos meus amigos de república, **Bolívia**, **Buxa**, **Pau**, **Morfo** e **Funga**. Pelo convívio inesquecível e pelo forte laço de amizade criado nesses quatro anos. Agradeço também por terem me acolhido desde meu primeiro dia em Botucatu e por terem tornado o desafio de morar fora de casa uma experiência única.

Aos amigos da **Turma XLI de Biomedicina da UNESP** pela valiosa ajuda nos momentos que precisei durante todo o período da graduação e por todos os bons momentos fora da faculdade. Fico muito feliz por saber que fiz verdadeiros amigos nessa turma.

Aos amigos da **Rep. Só-kanela** e **agregados** que ajudaram a tornar esse período inesquecível na minha vida e por todos os momentos sensacionais passados juntos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Instituto de Biociências de Botucatu pela preciosa oportunidade de ter me graduado em um ótimo curso e por terem dado totais condições para que eu me formasse um biomédico capaz de honrar a minha profissão.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu, seus **técnicos e funcionários** por ter dado toda infra-estrutura, condições e ajuda necessários para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Resumo

Espécies do gênero *Strongyloides* são importantes parasitas de humanos e animais domésticos e aquelas que parasitam roedores são freqüentemente utilizadas como modelos experimentais para o estudo da strongiloidíase. *S. venezuelensis* parasita ratos (*Rattus norvegicus*) e seu estudo tem permitido o entendimento de mecanismos imunológicos envolvidos na relação parasita–hospedeiro da strongiloidíase humana e animal. O diagnóstico parasitológico de *S. venezuelensis* pode ser realizado pela detecção de ovos embrionados nas fezes, com o uso do OPG (ovos por grama de fezes), também empregado no monitoramento da infecção. Entretanto, essa técnica se mostra pouco sensível quando a carga parasitária é leve. Os métodos moleculares aumentam a sensibilidade e a especificidade das análises. A PCR tem se mostrado como uma técnica sensível e precisa na detecção de parasitas em tecidos e fezes de hospedeiros infectados. A fim de comparar a sensibilidade das técnicas de OPG e PCR em ratos Lewis infectados por *S. venezuelensis*, foram realizados dois protocolos no presente estudo. No Protocolo I foi comparada a sensibilidade das duas técnicas em amostras de ratos Lewis com diferentes cargas parasitárias. A PCR com o emprego par de *primers* descrito por Dorris et al. (2002) obteve melhores resultados que o OPG nos grupos inoculados com 40 L3, considerada como infecção leve. Entretanto, não foi verificada diferença estatística significativa entre as técnicas ($P>0,05$), provavelmente por terem sido utilizados poucos animais ($n=10$). O outro par de *primers* utilizado foi desenhado a partir de uma sequência parcial do gene do rDNA de *S. venezuelensis* e não foi capaz de detectar a presença do DNA do helminto em nenhuma amostra desse grupo. Já nos grupos inoculados com 400 e 4000 L3, tanto a PCR com o par de *primers* descrito por Dorris et al. (2002) quanto o OPG detectaram a presença do parasita nas fezes dos animais. O par de *primers* desenhado obteve resultados semelhantes nesses dois grupos e não apresentou diferença significativa em relação às outras técnicas ($P>0,05$). No Protocolo II, a infecção por *S. venezuelensis* em ratos Lewis apresentou período pré-patente de seis dias e picos de eliminação de ovos no oitavo e no 11º dias. Foram detectadas fêmeas no intestino delgado dos animais e ovos nas fezes até o 32º dia após a infecção. A PCR com o par de *primers* descrito por Dorris et al. (2002) detectou *S. venezuelensis* nas fezes, principalmente a partir do 23º dia após a infecção, quando o OPG variou entre 0 e 100 e não detectou a presença de ovos nos dias 23, 24, 25, 27, 28, 29 e 31. Nos dias 24 e 28, a PCR (DORRIS et al., 2002) detectou a presença de DNA do helminto. Já o par de *primers* desenhado não foi capaz de detectar DNA de *S. venezuelensis* a partir do 20º dia de infecção.

Lista de ilustrações

Figura 1. Teste da PCR com <i>primers</i> específicos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e diferentes concentrações de DNA (50ng/μl, 25ng/μl e 12,5ng/μl).....	37
Figura 2. Teste da PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> e diferentes concentrações de DNA (50ng/μl, 6,25ng/μl e 3,12ng/μl).....	38
Figura 3. Teste da PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> e diferentes concentrações de DNA (50ng/μl, 1,56ng/μl e 0,78ng/μl).....	39
Figura 4. Teste da PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> e diferentes concentrações de DNA (50ng/μl, 0,39ng/μl e 0,195ng/μl).....	40
Figura 5. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> e amostras de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 1 e 2) infectados.....	41
Figura 6. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> em amostras de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 3 e 4) infectados.....	42
Figura 7. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> em amostras de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 5 e 6) infectados.....	43
Figura 8. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> genéricos (DORRIS et al., 2002) em amostras de DNA de <i>S. venezuelensis</i> e das fezes de ratos (Grupos 1 e 2) infectados....	44
Figura 9. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> genéricos (DORRIS et al., 2002) em amostras de DNA de <i>S. venezuelensis</i> e das fezes de ratos (Grupos 3 e 4) infectados....	45
Figura 10. Resultados do Protocolo I. PCR com <i>primers</i> genéricos (DORRIS et al., 2002) em amostras de DNA de <i>S. venezuelensis</i> e das fezes de ratos (Grupos 5 e 6) infectados....	46
Figura 11. Relação entre OPG, número de parasitas recuperados e tipos de inóculos (4000, 400 e 40 L3 de <i>S. venezuelensis</i>) (Protocolo I).....	47
Figura 12. OPG dos animais do grupo Fase de Eliminação, infectados com 4000 L3.....	48
Figura 13. Produção de anticorpos em ratos Lewis infetados (Fase Aguda a e b; Fase Recuperação c e d).....	49
Figura 14. Resultados da Fase Aguda do Protocolo II. PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> em amostras fecais de ratos infectados.....	50
Figura 15. Resultados da Fase Aguda do Protocolo II. PCR com <i>primers</i> genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras fecais de ratos infectados.....	51
Figura 16. Resultados da Fase de Eliminação do Protocolo II. PCR com <i>primers</i> específicos de <i>S. venezuelensis</i> em amostras fecais de ratos infectados.....	52

Figura 16. Resultados da Fase de Eliminação do Protocolo II. PCR com <i>primers</i> genéricos (DORRIS et al., 2002) em amostras fecais de ratos infectados.....	53
---	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Teste da PCR com diferentes concentrações (50ng/μl, 25ng/μl e 12,5ng/μl) de DNA de larvas de <i>S. venezuelensis</i> utilizando <i>primers</i> específicos (desenhados).....	66
Tabela 2. Teste da PCR com diferentes concentrações (50ng/μl, 6,25ng/μl e 3,12ng/μl) de DNA de larvas de <i>S. venezuelensis</i> utilizando <i>primers</i> específicos (desenhados).....	67
Tabela 3. Teste da PCR com diferentes concentrações (50ng/μl, 1,56ng/μl e 0,78ng/μl) de DNA de larvas de <i>S. venezuelensis</i> utilizando <i>primers</i> específicos (desenhados).....	68
Tabela 4. Teste da PCR com diferentes concentrações (50ng/μl, 0,39ng/μl e 0,195ng/μl) de DNA de larvas de <i>S. venezuelensis</i> utilizando <i>primers</i> específicos (desenhados).....	69
Tabela 5. Resultados do Protocolo I. PCR (<i>primers</i> desenhado e genérico), OPG e número de parasitas recuperados dos ratos inoculados com 4000 L3.....	70
Tabela 6. Resultados do Protocolo I. PCR (<i>primers</i> desenhado e genérico), OPG e número de parasitas recuperados dos ratos inoculados com 400 L3.....	71
Tabela 7. Resultados do Protocolo I. PCR (<i>primers</i> desenhado e genérico), OPG e número de parasitas recuperados dos ratos inoculados com 40 L3.....	72
Tabela 8- Comparação entre as técnicas de OPG, PCR com o par de <i>primers</i> desenhado e genérico (DORRIS et al., 2002) referentes aos animais do Protocolo I.....	73
Tabela 9. Resultados do Protocolo II - Fase Aguda. OPG, PCR (par de <i>primers</i> desenhado e genérico) e média do número de parasitas recuperados.....	74
Tabela 10. Resultados do Protocolo II – Fase de Eliminação. OPG, PCR (par de <i>primers</i> desenhado e genérico) e média do número de parasitas recuperados.....	75

Lista de abreviaturas, unidades e símbolos

DNA: ácido desoxirribonucléico	μl: microlitro
rDNA: DNA ribossômico	cm: centímetro
dNTP: Trifosfatos de desoxirribonucleosídeos	nm: nanômetro
ELISA: ensaio imunoenzimático	M: molar
HIV: vírus da imunodeficiência humana	mM: milimolar
IgE, G, G1, G2b: imunoglobulinas E, G, G1, G2b	°C: graus Celsius
IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 18: interleucinas 2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 18	Nº: número
L3: larva de terceiro estágio	♀: feminino
MHC: complexo principal de histocompatibilidade	♂: masculino
OPG: contagem de ovos por grama de fezes	®: marca registrada
pb: pares de base	
PCR: reação em cadeia de polimerização	
RPMI: Roswell Park Memorial Institute	
BCA: ácido bicinconínico	
OPD: orto-fenil-diamina	
PBS: salina tamponada com fosfato	
HCl: ácido clorídrico	
KCl: cloreto de potássio	
MgCl ₂ : cloreto de magnésio	
Na ₂ CO ₃ : carbonato de sódio	
NaHCO ₃ : bicarbonato de sódio	
NaCl: cloreto de sódio	
CA: Califórnia	
EUA: Estados Unidos da América	
NJ: Nova Jersey	
V: volume	
g: grama	
mg: miligrama	
ng: nanograma	
ml: mililitro	

Sumário

Resumo

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, unidades e símbolos

Sumário

1. Introdução.....	2
1.1 Utilização da espécie <i>Rattus norvegicus</i> (rato) como modelo experimental.....	2
1.2 O gênero <i>Strongyloides</i> e a strongiloidíase.....	2
1.3 Uso de OPG e PCR para detecção de parasitas.....	8
1.4 Resposta imunológica aos helmintos.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Material e métodos.....	14
3.1 Protocolos Experimentais.....	14
3.1.1 Protocolo Experimental I.....	14
3.1.2 Protocolo Experimental II.....	16
3.2 Animais e infecção experimental.....	18
3.3 Monitoramento da infecção.....	18
3.4 Determinação da carga parasitária.....	19
3.5 Pesquisa de <i>S. venezuelensis</i> nas fezes por PCR.....	19
3.5.1 Extração de DNA.....	19
3.5.2 Par de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	20
3.5.3 Condições de PCR e emprego do par de <i>primers</i>.....	20
3.5.4 Análise da amplificação.....	21
3.6 Obtenção de antígeno solúvel de <i>Strongyloides venezuelensis</i>.....	21
3.7 ELISA para detecção de anticorpos (anti-<i>Strongyloides venezuelensis</i>)	21
3.8 Análise estatística.....	22
4. Resultados e discussão.....	23
4.1 do Protocolo I.....	23
4.1.1 Análise parasitológica (OPG e contagem de parasitas intestinais).....	23
4.1.2 Análise por PCR.....	24

4.1.3 Comparação da sensibilidade das técnicas de OPG, PCR e contagem de parasitas intestinais.....	27
4.2 do Protocolo II.....	29
4.2.1 Análise parasitológica (OPG e contagem de parasitas intestinais).....	29
4.2.2 Resposta imune induzida pela infecção primária com <i>S. venezuelensis</i>.....	33
4.2.3 Análise por PCR.....	34
4.2.4 Comparação entre as técnicas de PCR, OPG e contagem de parasitas intestinais.....	34
4.3 Comparação das técnicas de OPG e PCR em relação a custo-benefício.....	36
5. Conclusões.....	54
6. Perspectivas futuras.....	55
Referências Bibliográficas.....	56

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Utilização da espécie *Rattus norvegicus* (rato) como modelo experimental

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, é um roedor da família Muridae (HARKNESS, 1993). Os ratos são amplamente utilizados e particularmente vantajosos na pesquisa biomédica que abrange as áreas de toxicologia, gerontologia, cardiologia, endocrinologia, odontologia, imunologia, reprodução, neurociência e parasitologia (ANDERSEN, 2004). Os motivos para a escolha de ratos como modelo experimental são a facilidade de cuidado e de manejo, o tamanho e o custo reduzido, a alta capacidade reprodutiva, gerações de curta duração, fácil adaptação a ambientes variados, sociabilidade e a existência de linhagens geneticamente definidas (ANDERSEN, 2004), bem como, a possibilidade de efetuar infecções e acompanhá-las, o que possibilita a realização de análises variadas. Amato Neto et al. (1997) postularam ainda que os resultados obtidos podem ser comparados com os aspectos da doença na espécie humana e em outras espécies animais.

1.2 O gênero *Strongyloides* e a strongiloidíase

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à família Rhabdiasidae. O gênero *Strongyloides* compreende mais de 52 espécies de nematódeos parasitas de vertebrados (COSTA-CRUZ, 2005). Diversas espécies do gênero *Strongyloides* são consideradas importantes parasitas gastrintestinais de humanos e animais domésticos (DAWKINS, 1989). Em mamíferos, há descrição das espécies *S. chapini*, *S. fereirai*, *S. fuelleborni*, *S. myopotami*, *S. papillosus*, *S. ransomi*, *S. stercoralis*, *S. venezuelensis*, *S. ratti* e *S. westeri* (VICENTE et al., 1997). As espécies que parasitam roedores são freqüentemente utilizadas como modelos experimentais para o estudo da strongiloidíase. *S. venezuelensis* é um nematódeo que parasita ratos (*Rattus norvegicus*), mas, recentemente, o camundongo (*Mus musculus*) tem sido empregado em infecções experimentais. Isso permitiu avanços no entendimento de mecanismos imunológicos envolvidos na relação parasita-hospedeiro da strongiloidíase humana e animal (SATO e TOMA, 1990).

Strongyloides spp. apresenta um ciclo de vida livre e um ciclo parasitário. A fase parasitária se caracteriza pela presença de fêmeas partenogenéticas no intestino delgado as quais produzem ovos larvados por partenogênese, isto é, desenvolvimento a partir de um ovo

não fertilizado. Após a eclosão, as larvas podem desenvolver-se em machos e fêmeas adultos de vida livre, o que pode ser seguido por uma sucessão de gerações de vida livre. Entretanto, sob certas condições, provavelmente relacionadas à temperatura e umidade, formam-se as larvas infectantes (L3), que podem infectar o hospedeiro por penetração cutânea ou ingestão. Então, migram via sistema venoso para os pulmões, onde ocorre muda para larva de quarto estágio, e depois para a traquéia. São posteriormente deglutidas e alcançam o intestino delgado onde se transformam em fêmeas partenogênicas (URQUHART et al., 1998).

A estrogiloidíase causada por *S. stercoralis* é uma das mais importantes infecções causadas por nematódeos em humanos (SIDDIQUI e BERK, 2001). As causas disso são, sobretudo, a capacidade de auto-infecção por parte do agente causal, a resistência ocasional à erradicação terapêutica, a dificuldade para eliminar as formas larvárias e o risco de hiperinfecção em indivíduos imunodeprimidos (AMATO NETO et al., 1997). É uma parasitose pouco estudada que infecta cerca de 100 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo geralmente encontrada em regiões com latitudes entre 35°N e 30°N (MATSUDA et al., 2003). Nos países desenvolvidos, a infecção acomete principalmente agricultores, hortigranjeiros, trabalhadores rurais, imigrantes e os viajantes que visitaram áreas endêmicas enquanto, nos países em desenvolvimento, que coincidem com essas áreas, a doença atinge principalmente crianças, pela freqüente permanência em solos contaminados (COSTA-CRUZ, 2005). No Brasil, a estrogiloidíase é uma doença de grande importância em saúde pública com taxas de infecção atingindo até 41,5% (COSTA-CRUZ, 2000), de acordo com as diferentes regiões e métodos de escolha para o diagnóstico parasitológico. Esta doença pode ocasionar uma infecção crônica persistente, com uma característica de auto-infecção e hiperinfecção envolvendo o pulmão e o sistema gastrointestinal, podendo ainda se disseminar para outros órgãos (SIDDIQUI e BERK, 2001). Os pacientes sintomáticos apresentam alteração pulmonar e gastrointestinal, sendo que a maioria destes descobre que tem a estrogiloidíase após o exame laboratorial revelar a presença de eosinofilia (VADLAMUDI et al., 2006).

S. stercoralis é uma espécie dimorfofóbica, apresentando uma forma parasitária e outra de vida-livre. O ciclo de vida de *S. stercoralis* é considerado complexo, uma vez que pode haver desenvolvimento no meio ambiente (ciclo de vida livre ou indireto) ou no hospedeiro humano (ciclo parasitário ou direto) (DE PAULA, 2004). O ciclo de vida livre se inicia com a passagem de larvas rabditóides juntamente com as fezes. No solo, sob condições favoráveis de umidade essas larvas se transformam em fêmeas e machos de vida livre. Esses

parasitas se reproduzem sexualmente e que podem produzir larvas filarióides infectantes (L3) ou machos e fêmeas de vida livre, mantendo o ciclo indireto no meio ambiente (VADLAMUDI et al., 2006).

No ciclo de vida parasitário, as larvas filarióides (L3) penetram na pele sendo levadas via sistema venoso onde passam primeiro pela aurícula e ventrículo direito do coração, depois pelas artérias pulmonares e rede capilar dos pulmões. Perfurando a parede dos capilares, chegam aos alvéolos e bronquíolos, onde os movimentos do epitélio ciliado promovem seu transporte passivo, junto com as secreções brônquicas, até a traquéia e a laringe, para serem deglutidas alcançando em seguida o intestino delgado (REY, 2001). No intestino delgado as fêmeas adultas se alojam nos tecidos da submucosa, onde terminam seu desenvolvimento e iniciam a postura de ovos. Esses ovos eclodem originando larvas rabidtóides que podem ser eliminadas nas fezes para continuar o ciclo direto, ou podem se desenvolver em larvas filarióides infectantes podendo penetrar na mucosa intestinal (auto-infecção interna), ou na pele da região perianal (auto-infecção externa) (LY et al., 2003). É provável que a capacidade de *S. stercoralis* causar auto-infecção interna se deva, em parte, à eliminação de larvas e não de ovos, como acontece com as demais espécies de *Strongyloides* parasitas de animais domésticos (BOWMAN, 2006).

As características clínicas desta geo-helminíase estão ligadas a diversos fatores, como grau de infecção parasitária, estado nutricional do hospedeiro, ausência de outras parasitoses gastrointestinais, migração das larvas no ciclo pulmonar, permanência e multiplicação da fêmea partenogenética na mucosa intestinal e nos locais ectópicos e estado imunitário do hospedeiro (MACHADO, 2003).

A infecção causada por *S. stercoralis* é comumente caracterizada em três tipos: aguda, crônica e disseminada (LY et al., 2003). As manifestações agudas podem ocorrer precocemente desde o contato inicial. Os sintomas observados são: eritema serpiginoso onde houve contato da larva com a pele, tosse mimetizando asma devido à migração da larva pelos pulmões, dor abdominal e/ou diarreia. Essas manifestações são vagas e se assemelham a outras doenças não sendo, habitualmente, diagnosticadas (VADLAMUDI et al., 2006).

A estrongiloidíase crônica é em geral assintomática, porém sintomas pulmonares e gastrintestinais podem ocorrer. A síndrome de hiper-infecção é caracterizada, apenas, pelo envolvimento gastrintestinal e pulmonar. É causada pela grande multiplicação e migração de larvas infectantes, especialmente em casos de imunossupressão. As manifestações clínicas incluem, além das já descritas, sangramento gastrintestinal e pulmonar (VADLAMUDI et al.,

2006). Algumas condições associadas com a infecção por HIV são conhecidas por predispor à síndrome de hiper-infecção, incluindo inanição e o uso de esteróides. O uso de corticosteróides em doenças imunossupressivas está associado com a hiper-infecção (SIDDIQUI e BERK, 2001). De acordo com Costa-Cruz (2005), os corticosteróides e seus metabólitos exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas intra-intestinais acelerando sua conversão (rabditóide em filarióide), favorecendo a auto-infecção ou ainda um efeito sobre a fêmea parasita levando ao aumento da ovoposição.

A forma disseminada da doença é definida como o envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas, além do pulmonar e gastrointestinal. A mortalidade pode chegar a 87% e é freqüentemente associada à infecção bacteriana secundária (LUNA et al., 2007).

As lesões provocadas pelo parasita na pele são relacionadas com a invasão larvária. Petéquias, edema e congestão podem ser observados no local da penetração (FERREIRA, 1991). Nos pulmões, a travessia das larvas do interior dos capilares para os alvéolos provoca hemorragia, infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e eosinófilos (REY, 2001). No duodeno e no jejuno, a presença e a atividade das fêmeas partenogenéticas, sua ovoposição, bem como a eclosão e a migração das larvas, na espessura da mucosa, produzem lesões de ordem mecânica, histolítica e irritativa, que levam a inflamação catarral, com infiltração de eosinófilos (COSTA-CRUZ, 2005).

A resposta imunológica do hospedeiro infectado com *S. stercoralis* é mediada por eosinófilos, mastócitos intestinais, IgE (imunoglobulina E), células Th2 e citocinas como IL-4 (interleucina 4), IL-5 (interleucina 5), IL-6 (interleucina 6), IL-9 (interleucina 9), IL-10 (interleucina 10) e IL-13 (interleucina 13). Estes mecanismos de defesa podem atuar contra a larva filarióide durante a fase migratória, sobre o parasita adulto no intestino delgado, ou em ambas as fases (VADLAMUDI et al., 2006).

O diagnóstico da strongiloidíase é usualmente realizado com base na detecção de larvas nas fezes (SIDDIQUI e BERK, 2001). Larvas de *Strongyloides* também têm sido encontradas no escarro, líquido ascítico, líquido pleural, urina e cistos cutâneos (FERREIRA, 1991). Exames como endoscopia digestiva, biópsia intestinal (realizada no duodeno, jejuno e íleo), necropsia de órgãos e esfregaços citológicos, também têm sido descritos como métodos de detecção de larvas de *S. stercoralis* (COSTA-CRUZ, 2005).

Observações das características morfológicas das larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis*, bem como a adoção de métodos parasitológicos específicos levam ao diagnóstico correto. Especial cuidado deve ser dispensado à presença de larvas de ancilostomídeos, bem

como de nematódeos de vida livre do gênero *Rhabditis* que podem gerar confusão no diagnóstico microscópico (BEAVER e JUNG, 1985 apud PEDRAZA, 2004).

Para recuperar larvas de amostras fecais são empregados os métodos de Baermann (BAERMANN, 1917) ou de Rugai (RUGAI et al., 1954). Estes métodos caracterizam-se pela simplicidade e rapidez de execução (REY, 2001). Apresentam como desvantagens a necessidade de fezes frescas e a possibilidade de contaminação do manipulador devido à motilidade das larvas (COSTA-CRUZ, 2005).

Entretanto, os métodos parasitológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase demonstram baixa sensibilidade (MACHADO et al., 2003). Ruano et al. (2005) observaram que a sensibilidade do método parasitológico foi de 30%, chegando a 50% quando foram efetuadas repetições dos exames. Isto se dá pois a eliminação das larvas ocorre de modo intermitente na maioria dos casos de estrogiloidíase crônica (PEDRAZA, 2004).

Diversos métodos de laboratório têm sido descritos para detectar a resposta imune humoral em indivíduos infectados por *S. stercoralis*. O método mais utilizado é o da imunofluorescência indireta, ELISA (SIDDIQUI e BERK, 2001). Entretanto, os testes sorológicos possuem algumas limitações, como a obtenção de quantidades de antígenos para fracionamento e análise e o fenômeno de “reação cruzada”, devido à grande complexidade antigênica que estes parasitas possuem em relação a bactérias e protozoários (ROSSI et al., 1993). Infecções com filarias e *Ascaris* spp. podem induzir resultados falso-positivos (KEISER e NUTMAN, 2004).

Espécies do gênero *Strongyloides* de roedores mantidas em laboratório como *S. ratti* e *S. venezuelensis* têm sido usadas, com êxito, como fontes de larvas filarióides para preparar extratos antigênicos que permitem detectar anticorpos séricos específicos em pacientes com estrogiloidíase (MACHADO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007).

A detecção de antígenos nas fezes por diversos ensaios de captura de antígenos têm sido cada vez mais utilizada (BOWMAN, 2006). A técnica de coproantígeno é baseada na detecção de antígeno, obtido a partir de produtos excretados e secretados por parasitas nas fezes do hospedeiro através de ELISA. Nageswaran et al. (1994) verificaram antígenos específicos de *S. ratti* em ratos Sprague-Dawley experimentalmente infectados. No entanto, a técnica apresentou uma baixa reação cruzada com os nematódeos *Necator americanus* e *Syphacia muris*.

É imprescindível dispor de melhores métodos diagnósticos a serem associados aos métodos convencionais a fim de propiciar maior sensibilidade e especificidade.

Strongyloides venezuelensis é um parasita de roedores, naturalmente encontrado em ratos (*Rattus norvegicus*) (MARUYAMA et al., 2006). Este parasita tem sido utilizado como modelo experimental para estudos de biologia (MARUYAMA et al., 2006; MATSUDA et al., 2003; OLIVEIRA e AMARANTE, 2001; NAKAI e AMARANTE, 2001), imunologia (KIMURA et al., 2006; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006), mecanismos de expulsão de parasitas (BAEK et al., 1999; EL-MALKY et al., 2003; NEGRÃO-CORRÊA, 2006), características bioquímicas (MARUYAMA e NAWA, 1997; MARUYAMA et al. 2006) e atividade anti-helmíntica (SATO et al., 2001; SATO et al., 2002).

Na infecção por *S. venezuelensis*, larvas infectantes de terceiro estágio penetram através da pele e migram para o pulmão, onde ocorre muda para larva de quarto estágio. Dessa forma atingem o intestino delgado onde, finalmente, se transformam em parasitas adultos (TINDALL e WILSON, 1988). Durante o processo de migração, esses parasitas secretam, por via oral, substâncias adesivas de origem glicoprotéica que auxiliam na invasão e no estabelecimento em tecidos do hospedeiro (MARUYAMA e NAWA, 1997). A composição dessas substâncias varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da larva no hospedeiro (MARUYAMA et al., 2006).

Estudos sobre o ciclo biológico de *S. venezuelensis* em hospedeiros roedores confirmam a existência de diferentes padrões de migração e distribuição deste parasita. Takamure et al. (1995) estudaram o padrão de distribuição e de migração de larvas infectantes de terceiro estágio (L3) de *S. venezuelensis* em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar e camundongos (*Mus musculus*) da linhagem ddy entre 24 e 96 horas após infecção por via subcutânea. Eles observaram que o parasita migrou através da via subcutânea ou intramuscular até os pulmões após 45 horas em ratos e 42 horas em camundongos. No intestino delgado a presença do parasita foi verificada 60 horas após infecção. Portanto, foi demonstrado que *S. venezuelensis* segue somente uma rota migratória através da via pulmonar (pele, músculo, pulmão, traquéia e intestino delgado), com duração semelhante em ambos os hospedeiros (rato, camundongo) após a infecção subcutânea.

Em trabalho similar, Matsuda et al. (2003) inocularam oralmente 1000 larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* em ratos da linhagem SDR e monitoraram cronologicamente a infecção. A presença de larvas infectantes foi detectada no fígado e no sangue 20 e 45 minutos após a inoculação, respectivamente. As larvas também foram encontradas, após 45 minutos e 120 horas, nos pulmões e no intestino delgado, respectivamente. Focos de lesões necróticas e de hiperemia foram observados no fígado e no

pulmão, juntamente com infiltrados de eosinófilos no estômago, fígado e pulmão. Os parasitas também foram encontrados em cortes histológicos de tecidos pulmonares, fígado e intestino delgado.

A dinâmica da infecção por *S. venezuelensis* é conhecida em diversas linhagens de camundongos e ratos, mas não na cepa isogênica de ratos Lewis. Estudos mostram que o período pré-patente na infecção por *S. venezuelensis* em roedores (camundongos e ratos) varia entre o 5º e o 8º dia após a infecção com um pico de eliminação de ovos nas fezes ocorrendo por volta do 7º ao 11º dia de infecção (TAIRA et al., 1995; NAKAI e AMARANTE, 2001; OLIVEIRA-SIQUEIRA e AMARANTE, 2001). As diferenças observadas nestes estudos podem ser atribuídas a diversos fatores relacionados ao hospedeiro (espécie, linhagem, idade, sexo e resistência) e ao parasita (linhagem, dose do inóculo e cultura de larvas infectantes) (SOLOMON e HALEY, 1966; CARTER e WILSON, 1989; SATO e TOMA, 1990; KHAN et al., 1993).

1.3 Uso de OPG e PCR para detecção de parasitas

A diferenciação, detecção e o diagnóstico das infecções parasitárias têm sido realizados por diversos métodos, desde os mais simples como técnicas biológicas e morfológicas até os testes mais complexos como bioquímicos, imunológicos e moleculares. Os métodos moleculares além de aumentarem a sensibilidade e a especificidade das técnicas, reduzem a subjetividade inerente à interpretação de resultados morfológicos e biológicos (ZARLENGA e HIGGINS, 2001).

A técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada é um método parasitológico que se fundamenta no encontro de ovos de nematódeos gastrintestinais em fezes e requer uma lâmina especial denominada de “Câmara de McMaster”. A determinação das espécies de parasitas é realizada através da observação do estado de desenvolvimento celular e da forma dos ovos recém excretados (UENO e GUTIERREZ, 1983). OPG é o número de ovos por grama de fezes. Conhecendo-se o OPG, pode-se calcular o número de vermes e estimar quantitativamente o efeito do controle das parasitoses, como também a eficácia dos anti-helmínticos (DE CARLI, 2001). Existem ainda outras técnicas que consistem na estimativa da contagem de ovos nas fezes, como a de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), utilizada em alguns trabalhos para monitoramento de infecções.

O diagnóstico parasitológico da estrongiloidíase causada por *S. venezuelensis* pode ser realizado através da detecção de ovos embrionados nas fezes. Alguns trabalhos demonstram a utilização do OPG no monitoramento da infecção por *S. venezuelensis* em roedores (NAKAI e AMARANTE, 2001; OLIVEIRA e AMARANTE, 2001). Entretanto, essa técnica se mostra pouco sensível quando a carga parasitária é leve. O mesmo problema também é encontrado para o diagnóstico de *S. stercoralis* em fezes humanas. A deficiência do diagnóstico parasitológico evidencia-se em pacientes que são submetidos a tratamento com imunossupressores para posterior transplante de órgãos e que, também apresentam infecção crônica e assintomática. Ao realizar-se a procura de ovos nas fezes desses indivíduos, alguns deles apresentam resultado negativo, pois nos casos de infecção crônica, as fêmeas eliminam poucos ovos por dia. Porém, após a imunossupressão, esses pacientes podem desenvolver hiperinfecção e estrongiloidíase disseminada, resultando em grave comprometimento (KEISER e NUTMAN, 2004).

A recente adoção da tecnologia de análise de ácidos nucleicos na detecção ou caracterização de parasitos tem apresentado resultados promissores. As técnicas apresentam-se reprodutíveis, sensíveis e de alta especificidade, sendo as seqüências alvo no DNA conservadas durante as distintas fases do ciclo desses parasitas (DE CARLI, 2001).

A PCR (Reação em Cadeia de Polimerização) apresenta-se como um método de extrema sensibilidade, permitindo a geração exponencial de cópias de seqüências específicas a partir de um DNA molde, por meio de uma síntese enzimática *in vitro* (DE CARLI, 2001), podendo desempenhar, dessa forma, um importante papel na epidemiologia, prevenção e tratamento de doenças parasitárias. Por ser um método direto não apresenta as ambigüidades características dos métodos considerados indiretos (ZARLENGA e HIGGINS, 2001). Esta técnica consiste basicamente em três etapas: a) desnaturação do DNA: a temperatura dos tubos de reação é elevada para 94°-96°C para que a fita dupla da molécula de DNA seja separada em duas fitas simples; b) anelamento do par de *primers*: a temperatura é reduzida (entre 37°-72°C) para que os *primers* de seqüência conhecida se liguem às regiões complementares do DNA alvo, sendo eles os pontos de partida da duplicação de cada nova dupla fita a ser sintetizada; c) extensão: a temperatura é elevada para cerca de 72°C para que uma DNA polimerase termoestável possa sintetizar as novas fitas, reconhecendo a extremidade 3' dos *primers*, ligada ao DNA molde, e adicionando os nucleotídeos de modo complementar à fita molde, produzindo uma nova dupla fita de DNA. Este ciclo é repetido cerca de 30 a 50 vezes, produzindo cópias de forma exponencial. Ao final de 35 ciclos são

geradas aproximadamente 68 bilhões de cópias do fragmento de estudo a partir de uma única cópia inicial (ALMEIDA, 2005).

Alguns autores já utilizaram a PCR para detecção de outras espécies de parasitas em amostras de fezes e obtiveram bons resultados. A alta sensibilidade para detectar patógenos e a velocidade com que essa técnica pode identificá-los no organismo com uma baixa carga parasitária constitui-se em uma das principais vantagens dessa técnica (WEISS, 1995). Em trabalho realizado por Wongratanacheewin et al. (2001), foi desenvolvido um método baseado na PCR para detecção de ovos de *Opisthorchis viverrini* nas fezes de hamsters experimentalmente infectados por este parasita. Os autores compararam as técnicas de OPG e PCR e verificaram que a PCR apresentou uma sensibilidade de 100% inclusive nos grupos com infecções leves. Sandoval et al. (2006) concluíram que a PCR com DNA extraído de fezes de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c foi mais sensível e mais precoce para detecção de *Schistosoma mansoni* que a técnica parasitológica de Kato-Katz (KATZ et al., 1972) nos dois tipos de inóculos testados (com 50 ou com 200 cercárias). Em amostras de animais inoculados com 200 cercárias, a PCR obteve 100% de sensibilidade contra cerca de 60% da técnica de Kato-Katz. Pontes et al. (2003) também relataram maior sensibilidade da técnica de PCR em relação à de Kato-Katz para detecção de ovos da mesma espécie nas fezes de humanos residentes de região endêmica para *Schistosoma mansoni*. A técnica molecular apresentou 97,4% de sensibilidade, enquanto a parasitológica obteve 78,9%, considerando-se 100% todas as amostras que obtiveram resultado positivo em, pelo menos, um dos métodos.

Estudos empregando a técnica de PCR para detecção de DNA de parasitas em tecidos e músculos também têm sido realizados. Toe et al. (1998), detectaram a presença de DNA do parasita *Onchocerca volvulus* através da PCR em raspados de peles de humanos e verificaram que essa técnica foi mais sensível e menos invasiva em relação ao exame de biópsia. Arriaga et al. (1995) detectaram a presença de larvas do parasita do gênero *Trichinella* em 80 amostras de músculo do diafragma de cavalos abatidos. Quatro dessas amostras foram caracterizadas como *Trichinella* sp através de critérios morfológicos e como *Trichinella spiralis* através de PCR.

1.4 Resposta imunológica aos helmintos

As diferentes famílias de parasitas helmintos possuem padrões específicos de estruturas que influenciam sua interação com o hospedeiro (DE VEER et al., 2007). A

imunidade contra os nematódeos gastrintestinais pode ser manifestada pela expulsão dos parasitas adultos, redução do tamanho do verme, diminuição da fecundidade da fêmea parasita, falha no estabelecimento e impedimento do desenvolvimento da larva no hospedeiro (ONAH e NAWA, 2000) e proteção contra re-infecção (DAWKINS, 1989).

A contribuição da IgE como mecanismo de proteção contra nematódeos gastrintestinais que penetram na mucosa do duodeno foi demonstrada em camundongos infectados por *S. venezuelensis* (NEGRÃO-CORRÊA, 2001). Silveira et al. (2002) também verificaram um aumento na concentração de IgE em lavado broncoalveolar no processo inflamatório observado em pulmões de ratos infectados por *S. venezuelensis*.

A contribuição de eosinófilos, mastócitos, células Th2 e citocinas como IL-3 (interleucina 3), IL-4 (interleucina 4), IL-5 (interleucina 5) e IL-10 (interleucina 10) como mediadores da imunidade contra *S. venezuelensis* tem sido demonstrada em várias publicações (MARUYAMA et al., 2000; ONAH et al., 2000; SILVEIRA et al., 2002; EL-MALKY et al., 2003; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004). Mais recentemente, Sasaki et al. (2005), avaliando camundongos C57Bl/6 STAT6(-/-) pré-tratados com IL-18 (interleucina 18) e IL-2 (interleucina 2), observaram um aumento no número de mastócitos intestinais e uma rápida expulsão de vermes adultos de *S. venezuelensis*. Por essa razão foi sugerido que a ativação de mastócitos da mucosa intestinal depende da IL-18 para expulsão de parasitas.

Fatores relacionados ao hospedeiro como idade, sexo e base genética influenciam diretamente a carga parasitária (RIVERO, et al., 2002). Estudos realizados com nematódeos intestinais utilizando linhagens isogênicas de roedores demonstram a influência de fatores genéticos associados à resistência e a suscetibilidade à infecção (BEHNKE et al., 2000). O tipo de resposta imunológica apresentada pelo hospedeiro (rápida e aguda ou fraca e lenta) é regulada por diversos genes. A diferença observada entre os hospedeiros também pode ser explicada pela variação de alelos associados com a resposta imune. Estudos demonstram a importância de genes pertencentes ao complexo maior de histocompatibilidade e de genes não relacionados ao MHC no controle da imunidade (BEHNKE et al., 2003).

A prevalência (proporção de indivíduos infectados) e a intensidade (severidade da infecção) causadas por protozoários, nematódeos, trematódeos, cestódeos e artrópodes são mais elevadas em machos do que nas fêmeas (KLEIN, 2004; ANURADHA e KATIIYAR, 1990). A influência do sexo em infecções helmínticas parece ser largamente hormonal, provavelmente em função do efeito dos hormônios sexuais na resposta imunológica do hospedeiro (ZUK e MCKEAN, 1996). Estudos em roedores confirmam que a influência do

sexo pode ser mediada por interações entre os sistemas imunológico e endócrino (MORALES-MONTOR et al., 2004). A presença de receptores de hormônios sexuais em células do sistema imunológico demonstra uma correlação direta entre os sistemas endócrino e imune (KLEIN, 2004). O sistema imunológico é influenciado por hormônios sexuais como testosterona, 17 β -estradiol e progesterona.

De acordo com Grossman et al. (1991), a testosterona possui propriedades imunossupressoras. Especificamente na imunidade inata, a resposta mediada por células e anticorpos é tipicamente maior nas fêmeas do que em machos. Nakanishi (1987), ao estudar a resposta celular de camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/c infectados por *Brugia pahangi*, verificou que as fêmeas apresentaram uma resposta mediada por macrófagos e eosinófilos mais intensa na cavidade peritoneal e se mostraram mais resistentes do que camundongos machos. A influência do sexo na susceptibilidade ao parasita e na resposta celular foi devida ao hormônio sexual do macho, a testosterona. A testosterona também diminuiu a resistência e a resposta de linfócitos, macrófagos e eosinófilos na cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6 infectados por *B. pahangi* (NAKANISHI et al., 1989).

Estudos utilizando animais castrados comprovam a influência da testosterona na suscetibilidade a parasitas. Kamis et al. (1992) ao estudarem ratos castrados não tratados com testosterona infectados com o nematódeo *Angiostrongylus malaysiensis*, verificaram uma redução no número de parasitas recuperados das artérias pulmonar e cerebral e aumento do número de leucócitos circulantes em relação aos ratos castrados que receberam doses diárias de testosterona. Rivero et al. (2002) também observaram que ratos Wistar castrados foram menos suscetíveis à infecção por *S. venezuelensis* em relação aos não castrados. O ocorrido foi devido à redução da testosterona plasmática nos animais castrados, pois ratas Wistar tratadas com testosterona foram mais suscetíveis à infecção por *S. venezuelensis*. Além disso, os autores também verificaram que o número de parasitas recuperados no pulmão foi maior nos machos mais velhos onde o nível de testosterona se mostrou mais elevado e menor nas fêmeas mais velhas, que apresentaram maiores níveis de estrogênio.

Estudos sobre a influência do sexo em infecções helmínticas têm sido realizados também em animais de produção. Ao infectarem cordeiros e cordeiras com 5000 L3 de *Haemonchus contortus* por via oral, Gauly et al. (2006) observaram que o OPG e a carga parasitária foram mais elevados nos machos do que nas fêmeas. Os autores também concluíram que as cordeiras são mais resistentes à infecção experimental por *H. contortus*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a dinâmica da infecção primária por *Strongyloides venezuelensis* em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Comparar a sensibilidade das técnicas OPG e PCR em ratos Lewis com diferentes cargas parasitárias.

2.2.2 Determinar a dinâmica da infecção primária por *S. venezuelensis* em ratos Lewis e a resposta imunológica nas Fases Aguda e de Eliminação da Infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

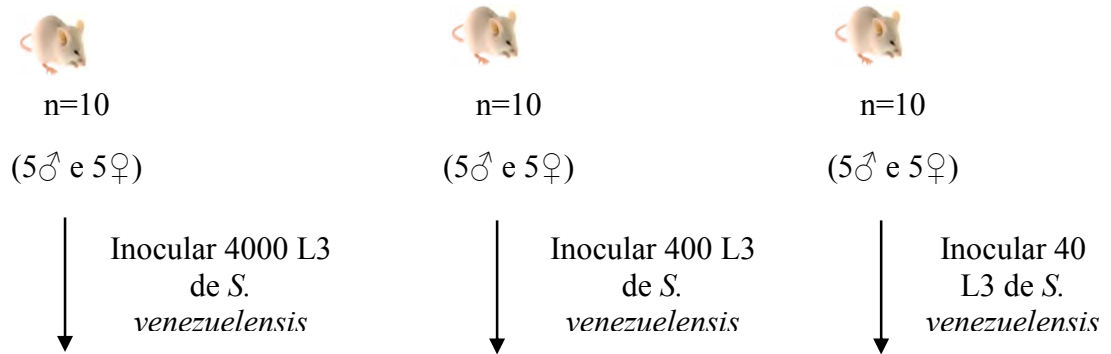
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolos Experimentais

3.1.1 Protocolo Experimental I

Neste protocolo foi comparada a sensibilidade das técnicas OPG e PCR em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis com diferentes cargas parasitárias. Para tanto, foram utilizados três grupos com 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) cada. Esses grupos foram inoculados por via subcutânea com aproximadamente 4000, 400 e 40 larvas infectantes (L3) de *Strongyloides venezuelensis*, respectivamente. Os animais foram sacrificados sete dias após a infecção e amostras de fezes foram coletadas de cada animal para determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG). Essas amostras também foram utilizadas para detecção do parasita através da PCR. Adicionalmente, foram quantificadas as fêmeas partenogenéticas que foram recuperadas do terço inicial do intestino delgado de cada animal. A correlação entre o número de ovos e a carga parasitária dos 10 animais de cada grupo foi medida a partir da determinação do número de ovos nas fezes e da contagem dos vermes adultos. A partir dessas amostras, também foi avaliada a influência do sexo dos animais na contagem de OPG e de vermes adultos. A correlação entre os dados de OPG, PCR e contagem de vermes de cada grupo foi utilizada para verificar a influência das diferentes cargas parasitárias na sensibilidade das técnicas.

Esquema do Protocolo I:



Após 7 dias de infecção, colheita de fezes dos animais, realização de sacrifício e quantificação das fêmeas adultas.

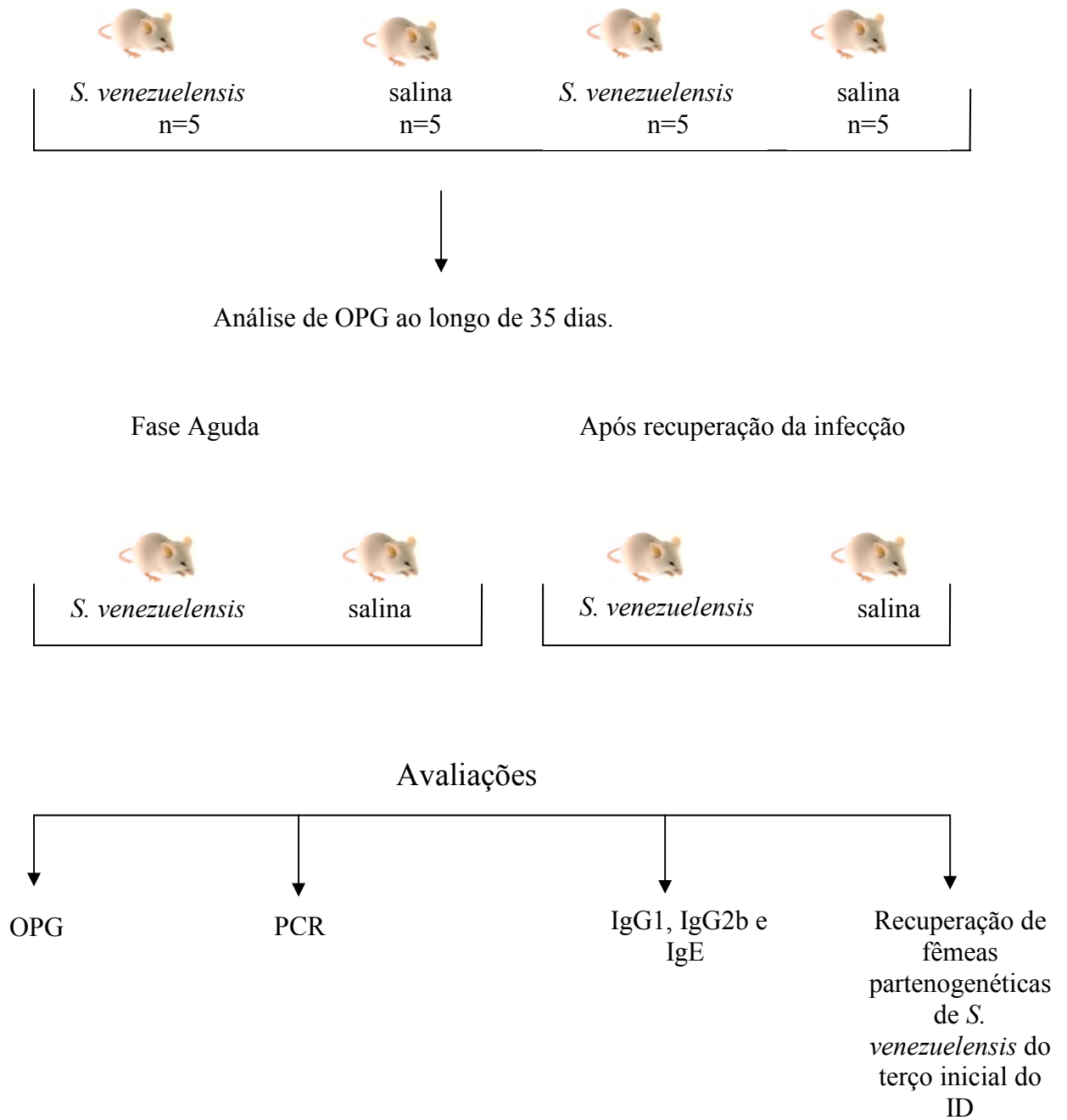
3.1.2 Protocolo Experimental II

No protocolo II foi determinada a resposta imunológica nas Fases Aguda e de Eliminação da Infecção primária por *Strongyloides venezuelensis* em ratos (*Rattus norvegicus*) fêmeas da linhagem Lewis. Foram utilizados dois grupos com 10 animais cada. Desses 10 animais, cinco foram utilizados como controle e 5 foram infectados por via subcutânea com 4000 larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis*. O primeiro grupo foi sacrificado no oitavo dia após a infecção (Fase Aguda) e o segundo grupo, após a eliminação da infecção (Fase de Eliminação da Infecção). Estes grupos foram avaliados quanto a parâmetros parasitológicos, imunológicos e moleculares. Para a análise imunológica foram coletadas amostras de soro de cada animal (controle e infectado) dos dois grupos para avaliação de anticorpos IgG1, IgG2b e IgE anti-*Strongyloides venezuelensis*.

Amostras de fezes dos cinco animais infectados de cada grupo foram coletadas diariamente e foram misturadas (somadas), constituindo-se em uma única amostra que foi empregada para OPG. Procedimento semelhante foi realizado para PCR, porém a colheita de amostras foi realizada a cada dois dias. Essas amostras foram utilizadas para comparar a sensibilidade das técnicas de OPG e PCR.

Também foi realizada a quantificação das fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do terço inicial do intestino delgado dos animais infectados. Os dados obtidos nas Fases Aguda e de Eliminação da Infecção foram comparados.

Esquema do Protocolo II:



3.2 Animais e infecção experimental

No Protocolo I foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Lewis (machos e fêmeas) com 6 semanas de idade, com peso corporal entre 140 e 160g. As matrizes desses animais foram obtidas no Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, e mantidas por dois anos no Biotério do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP. Os animais utilizados neste protocolo foram alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum*.

Já no Protocolo II foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Lewis (fêmeas) com 6-8 semanas de idade, com peso corporal entre 120 e 160g, obtidos no Biotério Central (Centro de Bioterismo) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP. Os animais também foram alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu.

Foi utilizada cepa de *Strongyloides venezuelensis* mantida em ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar no Departamento de Parasitologia-Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu desde seu isolamento no início da década de 80.

Larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* foram produzidas em cultura usando fezes de cavalo esterilizadas como substrato. Fezes de ratos infectados foram homogeneizadas com o substrato, umedecidas e mantidas em placa de Petri em uma estufa a 25° C. Após três dias de incubação, as larvas infectantes (L3) foram recuperadas por filtração e decantação em água destilada utilizando-se aparelho de Baermann. As larvas recuperadas foram lavadas várias vezes com solução tampão fosfato (PBS) e quantificadas. Para determinação do número de larvas obtidas, alíquotas de 10 µl de suspensão larval foram contadas em dez replicatas. Após ajuste do volume, os animais foram inoculados subcutâneamente na região do abdômen com 0,1 ml da suspensão contendo o número desejado de larvas infectantes (AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002), em experimento realizado previamente no Departamento de Parasitologia deste instituto pelo doutorando Nelson Mendes Marra.

3.3 Monitoramento da infecção

A intensidade da infecção por *S. venezuelensis* foi monitorada pela análise de OPG segundo a técnica de McMaster modificada (GORDON e WHITLOCK, 1939), em análise

realizada pelo doutorando Nelson Mendes Marra. Para a colheita das amostras fecais, os animais foram distribuídos em caixas com fundo telado, com capacidade para cinco animais, onde permaneceram por 3 horas. No protocolo II as fezes eliminadas pelos cinco animais foram colhidas e representaram uma amostra. No protocolo I as fezes foram colhidas individualmente dos animais.

3.4 Determinação da carga parasitária

Além do OPG, a carga parasitária é outro resultado que pode ser útil para a comparação com o PCR para comprovar a existência de infecção parasitária.

Assim, para a determinação do número de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*, os animais foram sacrificados sete dias após a infecção e o intestino delgado (14 cm iniciais) foi retirado, invertido e afixado em uma haste de arame. Em experimentos prévios realizados por Oliveira e Amarante (2001) e Nakai e Amarante (2001), foi observado que o maior número de nematódeos é recuperado sete dias após a infecção e que mais de 95% dos parasitas se localizam nos 14 cm iniciais do intestino delgado (NAKAI e AMARANTE, 2001).

Cada um dos intestinos foi colocado em um tubo de ensaio (20 ml) contendo solução salina (0.85% NaCl) e mantido em estufa a 37 °C por quatro horas. Após esse período, as hastes com os intestinos foram agitados vigorosamente para o desprendimento completo dos vermes. À solução contendo os vermes foi adicionada solução de formaldeído (38% w/w formalina) numa concentração final de 5% (v/v) para preservação dos mesmos, que foram contados utilizando microscópio esterioscópico.

3.5 Pesquisa de *S. venezuelensis* nas fezes por PCR

3.5.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído com o emprego do QIAamp[®] DNA stool mini kit (QIAGEN[®], GmbH, Hilden, Alemanha) a partir de 250mg de amostras fecais dos ratos (*Rattus norvegicus*) do protocolo I e II. No protocolo I foram utilizadas amostras individuais de cada rato, enquanto no protocolo II, foi realizado um *pool* de fezes de cinco animais. Amostras de DNA de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis*, produzidas em coproculturas, e extraídas com o emprego do QIAamp[®] DNA mini kit (QIAGEN[®], GmbH,

Hilden, Alemanha) foram utilizadas como controle positivo. Previamente à extração, as larvas infectantes foram submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a fim de facilitar a ruptura da cutícula das mesmas (WIMMER et al., 2004).

3.5.2 Par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados. Um deles foi desenhado a partir da sequência parcial do gene do rDNA de *Strongyloides venezuelensis* obtida no GenBank (Acesso: AJ417026) com o emprego do *software* de análise de sequência Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). Para facilitar a identificação, esse par de *primers* foi denominado de desenhado e foi testado e empregado na realização de PCR (Reação em Cadeia de Polimerização), usada para detectar a presença de *Strongyloides venezuelensis* nas fezes dos animais.

O outro par de *primers* utilizado foi descrito por Dorris et al. (2002) e amplifica sequências de rDNA em diferentes espécies de helmintos do gênero *Strongyloides* e de espécies aparentadas. Esse par de *primers* foi empregado, neste estudo, para detectar a presença de *Strongyloides venezuelensis* nas fezes dos animais e foi chamado de genérico por amplificar diferentes espécies dentro deste gênero.

3.5.3 Condições de PCR e emprego do par de *primers*

A amplificação foi realizada numa reação com 10 µl, 10 mM Tris-HCl 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3, 100 mM de cada dNTP, 100 ng de DNA genômico e 0,5 unidades de *Taq* polimerase[®] (Amersham Biosciences[®], Piscataway, NJ, EUA). A PCR compreendeu 40 ciclos, precedidos por 95°C durante 5 minutos. Cada ciclo constituiu-se por 30 segundos a 95°C (temperatura de desnaturação), 30 segundos a 60 °C (temperatura de anelamento para ambos os pares de *primers*), e 30 segundos a 72°C (temperatura de síntese de DNA). Para amplificação foram utilizados os termocicladores My Cycler[®] versão 1.065 (Bio-Rad[®]) e Gene Amp PCR System 9700[®] (Applied Biosystems[®]).

3.5.4 Análise da amplificação

Após cada reação, os produtos de amplificação foram homogeneizados com 2µl de tampão de corrida e submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Após as eletroforeses, os géis foram submetidos à luz ultravioleta e as imagens foram registradas com o captador de imagens Infinity 3000 WL/LC/26M[®] (Vilber Lourmat[®]) e analisadas com o emprego do *software* Infinity-Capt[®] versão 15.01. Este *software* determinou o tamanho das bandas de amplificação presentes nos géis com base na comparação com os marcadores moleculares de 100 e 50pb (Amersham Biosciences[®]).

3.6 Obtenção de antígeno solúvel de *Strongyloides venezuelensis*

O preparo deste antígeno foi realizado de acordo com a metodologia descrita por NEGRÃO-CORRÊA et al. 2004, modificada. Larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* (produzidas conforme descrito no item animai e infecção experimental) foram submetidas a vários ciclos de lavagem com solução tampão fosfato (PBS, 0.01 M, pH 7.2) e ressuspensas em meio RPMI contendo um coquetel inibidor de proteases (um tablete para cada 25 ml de meio RPMI; Complete-Mini, Roche). Em seguida, as larvas foram rompidas por mistura com pérolas de vidro e agitação em vórtex (5 ciclos de 1 minuto) e depois submetidas à sonicação (10 ciclos de 1 minuto). O material insolúvel foi removido por centrifugação e a concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA - Ácido Bicinconínico, com a utilização de um kit comercial (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit - Sigma). O antígeno solúvel obtido foi estocado a -80 °C.

3.7 ELISA para detecção de anticorpos (anti-*Strongyloides venezuelensis*)

Soros dos animais do Protocolo II foram utilizados para detecção de anticorpos específicos anti-*S. venezuelensis*. Placas de 96 poços foram recobertas com 100µl/poço do antígeno de *S. venezuelensis* na concentração de 100µg/ ml, diluído em tampão de ligação (Na₂CO₃ 17mM, NaHCO₃ 9,6 mM, pH 9,6) e incubadas a 4°C, durante uma noite. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween 20 (0,05%) e bloqueadas com 300µl por poço de PBS / Tween 20 (0,05%) e soro fetal bovino (10%). As placas foram incubadas por uma hora, a 37°C e lavadas novamente. As amostras de soro foram diluídas

1/10 em tampão de bloqueio e incubadas a 4°C, por uma noite. As placas foram lavadas e posteriormente incubadas por mais uma noite, a 4°C com 100µL por poço de anticorpo biotinilado anti-IgG1 ou anti-IgG2b de rato (Oxford Biotechnology®) diluído em tampão de bloqueio na concentração de 500 ng/ml e 250 ng/ml, respectivamente. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100µl por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB® - Dako Corporation®) diluído em tampão bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, a temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100µl por poço de solução de OPD (Sigma®) e a reação interrompida com a adição de 50µl por poço de H2SO4 a 2N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

3.8 Análise estatística

Os dados referentes ao protocolo I foram submetidos à análise estatística de acordo com Cody e Smith (2006). No protocolo I foi determinado o coeficiente de correlação entre os seguintes parâmetros: contagem de parasitas, OPG e tipo de inóculo (Figura 11). Foi realizada análise de variância para verificar a influência do sexo dos animais na recuperação de parasitas e no OPG. O nível de significância foi de 5%. Para as características parasitológicas, a análise estatística foi realizada com os dados transformados ($\log_{10} + 1$). Porém, neste relatório são apresentadas somente as médias aritméticas ($\pm$ erro padrão) não transformadas.

A associação entre os métodos utilizados para o diagnóstico de *S. venezuelensis* foi avaliada pelo teste Exato de Fisher. A concordância entre as técnicas empregadas foi determinada através do teste de McNemar.

Para as variáveis paramétricas dos resultados obtidos no Protocolo II (produção de anticorpos), os valores obtidos foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t de Student. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartilico e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%. Estes dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows® version 2.0 1995, Jandel Corporation®, San Rafael, CA, USA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 do Protocolo I

4.1.1 Análise parasitológica (OPG e contagem de parasitas intestinais)

A Tabela 5 mostra os resultados da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e do número de parasitas recuperados do intestino delgado dos animais do grupo inoculado com 4000 L3 de *S. venezuelensis*. Na Tabela 6, OPG e contagem de vermes dos animais inoculados com 400 L3 e na Tabela 7, OPG e parasitas recuperados em animais inoculados com 40 L3. As três tabelas contêm ainda os resultados das PCR com os *primers* desenhado e genérico.

Houve diferença estatística significativa entre os tipos de inóculos utilizados em cada grupo com o OPG ($P < 0,001$). Diferença estatística também foi verificada entre os três tipos de inóculos e o número de parasitas recuperados do intestino delgado ($P < 0,001$). O coeficiente de correlação entre os tipos de inóculos com OPG e o número de parasitas recuperados foi 0.893. A Figura 11 mostra os resultados da regressão linear aplicada aos dados agrupados e submetidos à transformação logarítmica. Pode-se observar que tanto o OPG quanto o número de parasitas recuperados são maiores nos grupos com maior inóculo.

Ao infectar ratos com 10000 L3 de *S. venezuelensis*, Tamura (1993) verificou que as contagens máximas de OPG foram proporcionais às doses infectantes tendo sido de 7040, 13320, 38400 e 58400 ovos em ratos infectados com 200, 1000, 5000 e 10000 larvas, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Nakai e Amarante (2001) em ratos Wistar infectados com 4000 e 500 L3 e as contagens de OPG foram 96900 e 17700 OPG, respectivamente. Taira et al. (1995) também observaram que ratos expostos às maiores doses de L3 de *S. venezuelensis* apresentaram OPG maior que os que foram infectados com menores doses. Animais expostos a 100 L3 apresentaram OPG médio de 1.500, enquanto os infectados com 100.000 L3 tiveram OPG de 240.000. Além disso, ratos infectados com doses intermediárias apresentaram OPG intermediário.

O número médio de exemplares recuperados nos machos e nas fêmeas inoculados com 4000 L3 foi $3276,2 \pm 676,6$ e $2349,2 \pm 95,3$, respectivamente. A média do OPG foi 34.040 e 15.500, respectivamente. Neste grupo foi verificada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre machos e fêmeas quanto ao número de parasitas recuperados. Com relação ao

inóculo contendo 400 L3, o número médio de parasitas recuperados nos machos foi $262 \pm 22,53$ e nas fêmeas $159,5 \pm 95,5$. A média do OPG nos machos foi 5.060 e nas fêmeas, 1.625. Este parâmetro apresentou-se estatisticamente diferente ($P < 0,06$) entre os sexos neste grupo. No inóculo com 40 L3, o número médio de parasitas recuperados nos machos foi $10,2 \pm 6,9$ e nas fêmeas $4,4 \pm 1,8$. A média do OPG foi 60 em machos e fêmeas. Nenhum dos dois parâmetros apresentou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre machos e fêmeas.

Segundo Grossman et al. (1991), a testosterona possui propriedades imunossupressoras. Rivero et al. (2002) observaram que ratos Wistar castrados foram menos suscetíveis à infecção por *S. venezuelensis* em relação aos não castrados. Esses autores também verificaram que os machos mais suscetíveis foram os mais velhos nos quais o nível de testosterona se mostrou mais elevado. Esses trabalhos corroboram os resultados do presente estudo, em que o OPG foi mais elevado nos machos inoculados com 400 L3. Além disso, no grupo infectado com 4000 L3, os machos apresentaram maior número de parasitas recuperados que as fêmeas. Neste trabalho, não pode ser medida a influência da idade na infecção, pois foram utilizados apenas animais adultos.

4.1.2 Análise por PCR

Primeiramente, foram realizados testes com a utilização do par de *primers* desenhado (a partir da sequência parcial do gene do rDNA de *Strongyloides venezuelensis*) a fim de determinar as melhores condições para amplificação da sequência específica pela PCR.

Esses testes foram realizados com amostras de DNA extraídas de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis*, produzidas em coproculturas e visaram principalmente determinar o tempo e a temperatura de anelamento mais adequados e que conferissem maior especificidade para o par de *primers* desenhado para a amplificação parcial da sequência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis*. Também foi testado o número de ciclos de amplificação. As temperaturas testadas foram de 58, 60 e 62°C e os tempos de anelamento 20 e 30 segundos. Já o número de ciclos variou entre 35 e 40. As melhores condições observadas foram 60°C por 30 segundos para o anelamento e 40 ciclos.

Em seguida foram realizadas reações para analisar a sensibilidade do par de *primers* na detecção de diferentes concentrações de DNA. As reações foram realizadas com volume de 1µl de DNA com diferentes diluições, e a técnica foi capaz de detectar concentrações de DNA

a partir de 0,195ng/μl. Os melhores resultados são apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4 e nas respectivas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Então, foram realizadas PCR com DNA extraído das fezes dos animais do protocolo I com o *primer* desenhado. O aumento do volume de DNA de 1 para 2μl, mostrou-se relevante para a detecção de bandas de amplificação. Amostras dos 10 animais inoculados com 4000 larvas infectantes (grupos 1 e 2) apresentaram bandas de amplificação, ou seja, resultados positivos para a análise por PCR. A maioria das amostras dos 9 animais inoculados com 400 larvas infectantes (grupos 3 e 4) também apresentou bandas de amplificação por PCR (Figura 6 e Tabela 6). Já as amostras dos 10 animais inoculados com 40 larvas infectantes (grupos 5 e 6) não apresentaram bandas de amplificação.

A partir desses resultados, também foram realizadas reações de PCR com o par de *primers* descrito por Dorris et al. (2002) que aqui, denominamos de genérico, pois foi utilizado pelos autores para amplificar diferentes espécies do gênero *Strongyloides*. Bandas de amplificação de *Strongyloides venezuelensis* foram observadas em todas as amostras (Tabela 8) dos grupos com infecção severa (4000 L3) (Figura 8), moderada (400 L3) (Figura 9) e leve (40 L3) (Figura 10). Porém, o *primer* genérico foi empregado, principalmente, para detectar a presença de DNA de *Strongyloides venezuelensis* nas amostras dos animais infectados com 40 L3, considerada como infecção leve, uma vez que o par de *primers* desenhado não foi capaz de fazê-lo (Figuras 7 e 10; Tabela 7).

Como os animais dos Protocolos I e II foram mantidos em um biotério do tipo convencional e não em um biotério que produz animais *germ free* onde as barreiras sanitárias são mais rigorosas, é provável que os animais tenham se contaminado com outros parasitas, tais como nematódeos do gênero *Syphacia*, comumente encontrado em biotérios. De acordo com Vicente et al. (1997) e Pinto et al. (2001) *Syphacia muris* é nematódeo parasita de rato (*Rattus norvegicus*). Adutos de *Syphacia* spp. são encontrados no ceco e no cólon anterior do hospedeiro, alimentando-se de bactérias presentes no lúmen. A maioria das fêmeas é fertilizada seis dias após a eclosão e permanecem mais 10 ou 11 dias no ceco até produzirem ovos. A postura desses ovos é realizada na região perianal do hospedeiro (PRITCHETT, 2007). Gilioli et al. (2000) realizaram um estudo parasitológico para verificar as condições de saúde de 10 colônias de ratos em 18 biotérios de instituições brasileiras e a prevalência de *Syphacia muris* foi de 80% nos biotérios analisados.

Para verificar se as bandas extras obtidas nos géis seriam desta espécie, amostras de DNA foram extraídas de exemplares destes vermes adultos recuperados de ratos Wistar

oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Os exemplares coletados foram contados, fixados em solução de álcool 70%, clarificados com lactofenol de Aman e analisados em sistema computadorizado de análise de imagens (QWin Lite[®] 3.1, Leica[®]), para observação de estruturas anatômicas específicas (VICENTE et al., 1997).

Desta forma, em todas as reações com o par de *primers* genérico adicionou-se, além do DNA de *Strongyloides venezuelensis* (poços de N^o2), DNA de *Syphacia muris* (poços de N^o3) que apresentaram bandas de amplificação de aproximadamente 340 e 380 pb, respectivamente. Essas amostras de DNA foram empregadas como controles positivos. O *primer* genérico também amplifica DNA de rato (420 pb) e por isso também foram adicionadas amostras de DNA extraídas do baço de um rato não infectado. Essa amostra foi utilizada como controle negativo para presença de parasitas e positivo para a amplificação de DNA de rato, uma vez que as bandas de amplificação de *S. venezuelensis*, *Syphacia* e rato são de tamanhos diferentes (340, 380 e 420 pb, respectivamente).

Considerando-se os resultados obtidos com a utilização do *primer* genérico, na Figura 8 são observadas apenas bandas de amplificação de *Strongyloides venezuelensis* de aproximadamente 340 pb, com amostras dos grupos 1 e 2 (animais inoculados com 4000 L3) (Tabela 5). A Figura 9 também mostra bandas de amplificação de *Strongyloides venezuelensis*, mas as amostras são dos grupos 3 e 4 (animais inoculados com 400 L3). Entretanto, também foi verificada a presença de bandas com tamanho aproximado de 420 pb nos poços 9 ao 13, que correspondem aos animais N^{os} 15, 17, 18, 19 e 20 (Tabela 6). A presença dessas bandas, juntamente com as de *Strongyloides venezuelensis*, nessas amostras é justificada pela presença de DNA do rato nas fezes, uma vez que essa banda ocorre em tecidos de ratos não infectados, o que pode ser constatado no poço 4 (controle). A ocorrência de bandas de aproximadamente 320 pb nos poços 7 e 10, que correspondem aos animais N^{os} 13 e 17, pode ser justificada pela presença de outros contaminantes nas fezes, já que o par de *primers* não é espécie-específico.

Na Figura 10 são observadas bandas de amplificação de *Strongyloides venezuelensis* com amostras dos grupos 5 e 6 (40 L3), exceto no poço 6, correspondente ao animal N^o 22, que também apresentou resultado negativo no OPG e que teve apenas uma fêmea partenogenética de *Strongyloides venezuelensis* recuperada de seu intestino delgado. Além das bandas de *Strongyloides venezuelensis* e de *Syphacia muris* foram observadas outras bandas

com tamanhos próximos de 320 e 420 pb (Tabela 7), indicando presença do DNA do rato, e de outros contaminantes presentes nas fezes dos animais analisados.

4.1.3 Comparação da sensibilidade das técnicas de OPG, PCR e contagem de parasitas intestinais

Comparando-se a PCR utilizando-se o *primer* desenhado com o OPG/contagem de parasitas, podemos observar que nenhuma das amostras dos 10 animais inoculados com 40 larvas infectantes apresentou bandas de amplificação, embora seis desses animais tenham OPG positivo e tenham sido recuperados parasitas do intestino delgado de todos eles (Figura 7 e Tabela 7). Além disso a PCR com esse par de *primers* não foi capaz de detectar a presença de *S. venezuelensis* em dois animais inoculados com 400 larvas (Figura 6). Esses animais, porém, apresentaram resultados positivos para OPG e contagem de parasitas intestinais (Tabela 6). Por sua vez, todos os animais inoculados com 4000 larvas apresentaram resultado positivo para a PCR, em conformidade com os dados do OPG e da contagem de fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis* (Figura 5 e Tabela 5). Houve diferença estatística significativa entre as técnicas apenas no grupo inoculado com 40 larvas ($P < 0,05$).

A discrepância entre os resultados observados entre OPG/contagem de parasitas intestinais e PCR com o par de *primers* desenhado nos grupos com infecção moderada e leve pode ser devida à baixa sensibilidade do par de *primers* empregado. O par de *primers* específico foi incapaz de detectar a presença do parasita quando a amostra de DNA de fezes extraída apresentou poucos ovos, tendo em vista que todos os animais negativos para PCR apresentaram OPG de 100 ou nulo. A única exceção é o animal 12 que teve OPG de 9100. Porém, isso deve ter ocorrido pelo fato de menos de 200 mg de fezes desse animal terem sido processadas pelo kit comercial utilizado para a extração, o que diminuiu a probabilidade de encontrar ovos e, conseqüentemente DNA (MATHIS e DEPLAZES, 2006). Apesar da baixa sensibilidade do par de *primers* desenhado em amostras com poucos ovos, a utilização deste par de *primers* mostrou-se bastante eficiente nos animais com infecção severa ou moderada.

Já o par de *primers* genérico demonstrou maior sensibilidade que o par de *primers* desenhado no grupo com inóculo de 40 L3. Embora tenham sido observadas bandas de amplificação de peso molecular diferente de 340 pb, correspondente à presença de DNA de *S. venezuelensis* nas amostras de fezes, este par de *primers* foi capaz de detectar quantidades diminutas de DNA em 9 das 10 amostras dos animais 21 ao 30 e dos animais 12 e 20, todos

eles com resultado negativo para a análise com o par de *primers* desenhado (Tabelas 6 e 7). Houve diferença estatística significativa ($P < 0,001$) entre os dois pares de *primers* no grupo inoculado com 40 larvas. Adicionalmente, pode-se afirmar que o par de *primers* genérico apresentou maior sensibilidade para detectar a presença deste nematóide em amostras fecais de ratos que a técnica de OPG no grupo inoculado com 40 L3. Isso pode ser observado na Tabela 7, onde os animais N^{os} 23, 27 e 28, que apresentaram OPG negativo (zero), apresentaram banda de amplificação de 340 pb. Entretanto, não foi verificada diferença estatística significativa entre as técnicas nesse grupo ($P > 0,05$), provavelmente por terem sido utilizados poucos animais ($n=10$). Apesar das evidências de que a PCR com o par de *primers* genérico seja mais sensível que o OPG para detecção de *S. venezuelensis* em infecções leves, são necessários estudos com maior número de animais infectados com 40 L3. Houve concordância entre as técnicas de OPG e PCR com o par de *primers* genérico na detecção de *S. venezuelensis* nas fezes dos animais com infecção leve.

A Tabela 8 mostra a comparação entre as sensibilidades das técnicas de OPG e PCR com os *primers* específicos para *Strongyloides venezuelensis* e os *primers* genéricos descritos por Dorris et al. (2002) dentro de cada grupo. Considerando-se os três grupos, o par de *primers* genérico apresentou sensibilidade de 96,6%, enquanto o par de *primers* específico obteve 58,6% e o OPG 86,2%.

Resultados similares foram obtidos por Pontes et al. (2003), que relataram maior sensibilidade da técnica de PCR em relação à técnica parasitológica de Kato-Katz (KATZ et al., 1972) para diagnóstico de *Schistosoma mansoni* nas fezes de humanos. A PCR apresentou 97,4% de sensibilidade, enquanto Kato-Katz obteve 78,9%, considerando-se 100% todas as amostras que obtiveram resultado positivo em, pelo menos, um dos métodos. Sandoval et al. (2006) também realizaram estudos para diagnosticar a mesma espécie, porém utilizando amostras fecais de camundongos da linhagem BALB/c e obtiveram resultados similares. A PCR obteve 100% de sensibilidade e a técnica de Kato-Katz cerca de 60%. No presente estudo a técnica parasitológica utilizada para monitorar a infecção por *Strongyloides venezuelensis* foi a de McMaster modificada (GORDON e WHITLOCK, 1939).

Wongratanacheewin et al. (2001) ao infectarem experimentalmente hamsters com o trematódeo *Opisthorchis viverrini* verificaram que a PCR apresentou sensibilidade superior à técnica de OPG mesmo no grupo com infecção leve (30 e 10% respectivamente, na quarta semana após a infecção). Utilizando-se de fezes humanas para a detecção do mesmo helminto, Duenngai et al. (2008) também obtiveram resultados positivos com o emprego da PCR em

28,6% das amostras aparentemente negativas com a análise parasitológica. Esses autores sugeriram ser a PCR o método mais sensível para analisar amostras dos grupos com infecção leve, corroborando os resultados do presente trabalho.

A técnica de PCR também já foi estudada como alternativa à necropsia de animais por Dinkel et al. (1998). Os autores observaram que a sensibilidade da PCR foi de 68%, enquanto a da necropsia foi de 59%.

4.2 do Protocolo II

4.2.1 Análise parasitológica

A Tabela 9 mostra os resultados da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) com amostras fecais dos animais do grupo Fase Aguda, inoculados com 4000 L3 de *S. venezuelensis*. Ovos de *S. venezuelensis* foram detectados nos exames de fezes dos dois grupos infectados a partir de seis dias após a infecção. No sexto dia, o OPG foi 8.000 enquanto no oitavo dia foi 55.400. Resultados semelhantes foram obtidos por Taira et al. (1995) ao infectarem ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD) com o mesmo nematódeo. Esses autores reforçaram que o período pré-patente variou do 6° ao 8° dia, dependendo do inóculo utilizado.

Na Tabela 10, são apresentados os resultados do OPG dos animais do grupo Fase de Eliminação da Infecção, também infectados com 4000 L3 de *S. venezuelensis*. A detecção dos ovos nas fezes desses animais também ocorreu no sexto dia após a infecção. Os maiores OPG no grupo Fase de Eliminação da Infecção foram registrados no oitavo, no sétimo e no 11° dias após a infecção, respectivamente (42.300, 26.000 e 21.300 ovos por grama de fezes). O OPG neste grupo começou a diminuir a partir do 12° dia. Do 21° ao 32° dias o valor de OPG variou entre 100 e 0 (Tabela 10).

Silveira et al. (2002) verificaram um pico na eliminação de ovos no sétimo dia (aproximadamente 17.000 OPG) em ratos Wistar infectados com 1500 L3 de *S. venezuelensis*. Já nos estudos realizados por Baek et al. (2003) em ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD) infectados via subcutânea com 1000 L3 de *S. venezuelensis*, o pico de eliminação de ovos ocorreu no 9° dia (aproximadamente 55.000 OPG) após a infecção. Ao infectar ratas Wistar com 500 L3 de *S. rattii* subcutaneamente, Wilkes et al. (2007) verificaram que a contagem

média de ovos nas fezes (aproximadamente 33.000 OPG) foi mais elevada no sétimo dia após a infecção.

Islam et al. (1999) ao infectarem ratos Fischer (F344) com 1000 L3 de *S. venezuelensis* por via subcutânea também detectaram ovos nas fezes a partir do 6º dia após a infecção. Entretanto, esses autores verificaram que a contagem máxima de ovos nas fezes foi no 9º dia após a infecção declinando até zero no 45º dia. Em estudo realizado por Nakai e Amarante (2001) utilizando-se ratos da linhagem Wistar infectados com 4000 L3 de *S. venezuelensis* por via subcutânea, foram observados três picos na eliminação de ovos. O maior deles no oitavo dia (96.900 OPG) e dois menores no 11º (60.000 OPG) e 21º dia (aproximadamente 35.000 OPG) após a infecção. Ao infectar ratos Wistar com *S. ratti*, Kimura et al. (1999) verificaram dois picos na eliminação de ovos. O maior pico foi entre 7-8º dias e um menor por volta de 25 dias após a infecção. No presente trabalho o ápice na eliminação de ovos também ocorreu por volta do oitavo dia (42.300 OPG) no grupo Fase de Eliminação da Infecção. Nesse grupo, outra elevação na contagem de OPG foi observada no 11º dia (21.300 OPG) (Figura 12 e Tabela 10). De acordo com Kimura et al. (1999), a segunda elevação na contagem de OPG seria produzida por vermes adultos localizados no ceco e no colo. Esses autores sugeriram que os vermes, uma vez eliminados do intestino delgado, estabeleceram-se no intestino grosso. De acordo com Viney (2002) nas infecções causadas por helmintos o estabelecimento, a sobrevivência e a fecundidade do parasita diminui quando a resposta imune do hospedeiro é montada. Durante o curso da infecção os parasitas sofrem uma redução no tamanho corporal e na taxa de fecundidade devido à ação de células e moléculas efetoras do sistema imune. Dessa forma, a migração dos parasitas para o ceco e colo seria um modo de restabelecer temporariamente a fecundidade e também um mecanismo de evasão do efeito citotóxico do sistema imunológico do hospedeiro. Recentemente, Shintoku et al. (2005) verificaram que fêmeas partenogênicas de *S. ratti* permaneceram por mais de 80 dias no intestino grosso de ratos, produzindo maior número de larvas infectantes em relação aos parasitas localizados no intestino delgado. Os autores concluíram que o parasitismo realizado no intestino grosso pode ser uma estratégia de sobrevivência adotada pelo parasita.

As contagens máximas de OPG registradas em ratas, neste trabalho, foram menores do que as obtidas em ratos por Nakai e Amarante (2001) e Baek et al (2003). De acordo com Grossman et al., (1991) a testosterona possui propriedades imunossupressoras. Isto explicaria as contagens menos elevadas de OPG nas fêmeas utilizadas no presente estudo. Além da

testosterona, outros fatores como a linhagem do animal e a dose do inóculo utilizadas também podem influenciar a quantidade de ovos eliminados. Taira et al. (1995) verificaram que a dose do inóculo interfere na intensidade do pico de eliminação. Eles observaram que dois ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD) infectados com 100 L3 apresentaram OPG máximo de 2200 e 800, enquanto os animais infectados com 100.000 L3 apresentaram pico de OPG de 134.000 e 346.000.

No presente estudo, o ápice do OPG (oitavo dia após a infecção) do grupo Fase Aguda foi 55.400, enquanto no grupo Fase de Eliminação da Infecção, o OPG foi 42.300. Essa diferença pode ter sido ocasionada por alguma variação na distribuição dos ovos do parasita nas amostras fecais obtidas dos animais. De acordo com Douch et al. (1996), essa variação depende de alguns fatores como o padrão diurno ou noturno de postura do parasita, o tempo de trânsito do alimento e das fezes no trato gastrointestinal e a consistência das fezes. Esses fatores podem afetar a mensuração do OPG diminuindo conseqüentemente a sua acurácia.

A contagem média de fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* no terço inicial do intestino delgado dos animais infectados dos grupos Fase Aguda e Fase de Eliminação da Infecção também pode ser observada nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. O número médio de parasitas recuperados foi $1732,6 \pm 1034,9$ no grupo Fase Aguda e $1,6 \pm 0,5$ no grupo Fase de Eliminação da Infecção. É provável que a diferença do número de parasitas recuperados entre os grupos seja devida ao processo de expulsão dos vermes pelo hospedeiro no decorrer da infecção.

No grupo Fase Aguda a maior contagem de parasita por animal foi 2979 e a menor 97. No grupo Fase de Eliminação da Infecção a maior contagem de parasita por animal foi 2 e a menor 1. De acordo com Oliveira e Amarante (2001), essa variação na carga parasitária apresentada no grupo Fase Aguda pode ser atribuída, principalmente, à resposta inata individual desses animais. No presente estudo o número médio de parasitas recuperados do grupo Fase Aguda ($1732,6 \pm 1034,9$) foi superior em relação aos resultados obtidos por Silveira et al. (2002), que recuperou no mesmo período $473,3 \pm 59,3$ parasitas de ratos Wistar infectados com 1500 L3. Os resultados aqui apresentados também diferem de Nakai e Amarante (2001), que observaram $292,2 \pm 125$ parasitas em ratos Wistar, também infectados com 4000 L3 de *S. venezuelensis*. Adicionalmente, Baek et al. (2003) ao infectarem ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD) com 1000 L3, recuperaram em média $336,8 \pm 70,7$ exemplares de *S. venezuelensis*. É provável que a variação na média de parasitas recuperados

no oitavo dia após a infecção seja devida à dose do inóculo utilizado, à linhagem do animal e/ou à cepa do parasita.

Na Fase de Eliminação da Infecção o número médio de parasitas recuperados no 32º dia de infecção foi $1,6 \pm 0,5$. Esse resultado foi inferior ao obtido por Islam et al. (1999) que obteve $31 \pm 12,7$ parasitas recuperados do intestino delgado de ratos Fischer (F344) infectados com 1000 L3 de *S. venezuelensis* no 35º dia após a infecção.

É provável que a variação na cinética da infecção no Grupo Fase Eliminação da Infecção e na média de parasitas recuperados no oitavo dia após a infecção do Grupo Fase Aguda seja devida à dose do inóculo utilizado, à cepa do parasita e/ou à linhagem do animal.

Estudos demonstraram que a dose do inóculo utilizada é proporcional ao número de ovos recuperados (TAMURA, 1993; TAIRA, 1995; NAKAI e AMARANTE, 2001). A quantidade de inóculo também interfere na imunidade e na carga parasitária de animais infectados. Ao testar quatro inóculos (500, 1000, 2000 e 4000 L3 de *S. venezuelensis*) em camundongos Swiss, Nakai e Amarante (2001) observaram que o maior número de parasitas adultos recuperados no intestino delgado foi no inóculo de 2000 L3. A carga parasitária dos animais infectados com o inóculo 4000 L3 foi inferior ao de 2000 L3. De acordo com os autores, a utilização de inóculos com número elevado de larvas provoca uma reação imunológica mais acentuada do hospedeiro resultando na eliminação mais rápida dos parasitas.

O grau de infectividade da cepa de um parasita pode variar de acordo com o tipo de hospedeiro natural e com a origem geográfica. Tem sido observado que quando nematódeos do gênero *Strongyloides* spp. são isolados de diferentes hospedeiros naturais, as cepas se desenvolvem de acordo com o ciclo direto ou indireto originando larvas filarióides com diferentes níveis de infectividade (MACHADO et al., 2007). Em alguns casos de infecção com uma cepa não patogênica, o hospedeiro desenvolve infecção assintomática podendo não se disseminar ou se tornar crônica. Entretanto, em casos de infecção por cepa patogênica, o hospedeiro desenvolve strongiloidíase sintomática ou síndrome de hiper-infecção, respectivamente (GROVE, 1996 apud MACHADO et al., 2007). Ao infectar camundongos Swiss com duas cepas (L2 e L49) de *Strongyloides venezuelensis* isoladas de diferentes espécies de roedores selvagem, Machado et al. (2007) verificaram que a cepa L2 estimulou mais a resposta imune humoral com altos níveis de IgG e IgG1, apresentando também uma melhor atividade no mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo envolvida na ativação de eosinófilos e expulsão do parasita. Os autores concluíram que a variação na

resposta apresentada pelas cepas foi devido as diferenças de origem geográfica e do hospedeiro natural. Estudos comparando a resposta à infecção com diferentes isolados geográficos de *Trichinella spiralis* e *Trichuris muris* em camundongos também demonstram diferenças no grau de infectividade entre as cepas do mesmo parasita (GOYAL e WAKELIN, 1993; BELLABY et al., 1995).

A influência da base genética do hospedeiro no curso, na cinética da infecção e na carga parasitária de nematódeos tem sido demonstrada em diversos estudos. As diferenças genéticas existentes nos diversos *loci* relacionados ou não ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) observadas entre as linhagens dos animais, influenciam na resistência à infecção. As diferentes combinações de genes também são responsáveis pela variação nas manifestações da resistência com efeitos na contagem de ovos nas fezes, no desenvolvimento do parasita e na carga parasitária (BEHNKE et al., 2003). Ao comparar a resposta de uma linhagem não isogênica e de quatro linhagens isogênicas de ratos com diferentes haplótipos para MHC infectados com 500 L3 de *S. ratti*, Gemmill e West (1998) verificaram que a linhagem do hospedeiro influenciou o padrão de produção larval.

4.2.2 Resposta imune induzida pela infecção primária com *S. venezuelensis*

Na fase aguda da infecção houve uma baixa produção de IgG1 (Figura 13a) e IgG2b (Figura 13b). Porém, já nesta fase pudemos observar que ocorreu um aumento significativo na produção destes anticorpos pelos animais infectados. A produção de IgG1 (Figura 13c) aumentou significativamente na fase de recuperação da infecção enquanto que a produção de IgG2b permaneceu baixa (Figura 13d). Apesar da baixa produção de IgG2b, os animais infectados produziram níveis significativamente maiores destes anticorpos comparados ao grupo controle. Amostras de soro encontram-se estocadas para determinação futura dos níveis de IgE.

As análises de Igs específicas para o parasita já indicaram, na fase aguda da infecção (8º dia), uma tendência para o perfil Th2 caracterizado por um discreto aumento de IgG1, mas não de IgG2b. Esta polarização Th2 ficou evidente na fase de recuperação da infecção, ocasião esta na qual se observa aumento significativo dos anticorpos IgG1 anti-parasitários. Estes resultados são coerentes com os descritos por outros autores. Por exemplo, altos níveis de IgG1 também foram detectadas no soro de camundongos infectados com *S. venezuelensis* (MACHADO et al., 2007) e de ratos Wistar infectados com *S. ratti* (WILKES et al., 2007).

Neste último estudo os autores chamam a atenção para o fato dos níveis de IgG1 terem aumentado de forma mais significativa justamente no período de eliminação dos vermes. Nossos resultados indicam a ocorrência de um fenômeno similar.

4.2.3 Análise por PCR

A Tabela 9 mostra os resultados de experimentos de PCR (com o par de *primers* desenhado e o par de *primers* genérico) realizados a partir do DNA de amostras fecais dos animais do grupo Fase Aguda, inoculados com 4000 L3 de *S. venezuelensis*. O par de *primers* desenhado foi capaz de detectar DNA de *S. venezuelensis* a partir do sexto dia após a infecção, como demonstrado na Figura 14. Nos poços 5 e 6 são observadas bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb, correspondentes às amostras dos sexto e oitavo dias, respectivamente. Esses resultados são corroborados pelo diagnóstico obtido com o par de *primers* genérico. Como pode ser observado na Figura 15, este par de *primers* detectou DNA de *S. venezuelensis* nos sexto e oitavo dias, apresentando banda de amplificação de aproximadamente 340 pb (Poços 8 e 9). Além disso, bandas de aproximadamente 420 e 380 pb foram amplificadas em algumas amostras. Essas bandas são referentes ao DNA de rato e de *S. muris*, respectivamente, conforme já observado no Protocolo I.

Na Tabela 10, são apresentados os resultados da PCR dos animais do grupo Fase de Eliminação da Infecção, utilizando os mesmos pares de *primers*. Novamente, ambos os pares de *primers* detectaram a presença de *S. venezuelensis* a partir do sexto dia. Porém, o par de *primers* desenhado não foi capaz de detectar o DNA do parasita a partir do 20º dia (Figura 16), enquanto o par de *primers* genérico (Figura 17) detectou DNA deste nematódeo do sexto até o dia do sacrifício dos animais (32º dia de infecção). Também foram verificadas bandas de amplificação de 420 e 380 pb quando o par de *primers* genérico foi empregado.

4.2.4 Comparação entre as técnicas de PCR, OPG e contagem de parasitas intestinais

A partir dos resultados aqui apresentados, pode-se observar que tanto o OPG, quanto a PCR (empregando os dois pares de *primers*) são eficientes para detectar ovos e DNA de *S. venezuelensis* em fezes de ratos Lewis a partir do sexto dia de infecção. Em alguns estudos a PCR foi capaz de detectar mais precocemente a infecção que a técnica de OPG. Wongratanacheewin et al. (2001), ao infectarem experimentalmente hamsters com o

trematódeo *Opisthorchis viverrini*, e verificaram que a PCR apresentou sensibilidade de 30 a 100% (grupos com infecção leve e severa, respectivamente) já na 4ª semana, enquanto o OPG, neste mesmo período, obteve de 10 a 87,5% nos mesmos grupos. Possivelmente, a maior precocidade da PCR em relação ao OPG não ocorreu no presente estudo, pois logo no sexto dia após a infecção, houve eliminação de grande quantidade de ovos nas fezes. Isto pode ter ocorrido pois os animais foram infectados por uma carga parasitária considerada alta (4000 L3). Já nos experimentos realizados por Wongratanacheewin et al. (2001) parte dos animais foi inoculada com carga parasitária baixa.

Apesar das três metodologias terem sido eficientes para diagnosticar os dias em que os ovos começaram a ser eliminados nas fezes, apenas a PCR com utilização do par de *primers* genérico foi capaz de diagnosticar a presença de *S. venezuelensis* do sexto até o 32º dia de infecção. Segundo Taira et al. (1995) fatores como a dose do inóculo utilizado podem interferir no tempo que o hospedeiro leva para eliminar totalmente a infecção. Animais inoculados com maior número de larvas tendem a eliminar mais rapidamente a infecção, provavelmente por provocam uma resposta imunológica mais intensa.

Por sua vez, o par de *primers* desenhado não foi capaz de detectar DNA de *S. venezuelensis* quando havia pequena quantidade de ovos nas fezes. Este par de *primers* mostrou-se eficiente até o 18º dia, quando o OPG foi 1000. A partir do 20º dia, quando o OPG sofreu uma redução para 200, esse par de *primers* tornou-se ineficaz. Os resultados do Protocolo I concordam com esse fato, uma vez que este par de *primers* foi incapaz de detectar DNA de *S. venezuelensis* em amostras com OPG por volta de 100.

Já o OPG, apesar de continuar detectando ovos do nematódeo além do 20º dia de infecção, não foi capaz de detectar a presença de ovos nos dias 23, 24, 25, 27, 28 29 e 31. Nos dias 24 e 28, a PCR com o par de *primers* genérico detectou a presença do DNA do helminto. Outra observação que pode ser feita é a correspondência entre a quantidade de OPG e a intensidade das bandas de amplificação referentes ao DNA de *S. venezuelensis* na PCR. A banda mais intensa em todas as reações se dá no 8º dia, quando o OPG atinge seu primeiro e maior pico (Figuras 12 e 14 a 17). À medida que a infecção vai sendo eliminada pelo hospedeiro, as bandas de amplificação tornam-se menos intensas.

4.3 Comparação das técnicas de OPG e PCR em relação a custo-benefício

Além da sensibilidade das técnicas, outros atributos são importantes na escolha da técnica a ser empregada para a realização das análises.

Em relação ao custo, a PCR apresenta-se como a técnica mais cara. A compra de materiais plásticos, kits de extração, reagentes utilizados para a amplificação para a eletroforese tornam os custos da técnica bastante elevados. O investimento inicial para realização da PCR também é alto. São necessários equipamentos como fluxo laminar, pipetas, termocicladores, centrífugas, cubas para eletroforese, sistema de captação de imagens entre outros. Já o OPG é uma técnica muito mais barata, pois emprega, basicamente, solução salina, lâminas (câmara de McMaster), e microscópio óptico.

Em relação ao tempo empregado para a realização das técnicas, a PCR requer, aproximadamente, 3 horas. Todavia ao se considerar o processo de extração e preparação das amostras de DNA é necessário adicionar por volta de 5 horas ao processo. Entretanto, várias amostras podem ser processadas ao mesmo tempo e durante a amplificação e mesmo, eletroforese não se faz necessária supervisão, ou seja, o responsável pelas análises pode desenvolver outras atividades durante esse tempo (PAZ E SILVA, 2007). O OPG é uma técnica mais rápida, levando poucos minutos para processamento e leitura da amostra. Porém, cada amostra precisa ser processada individualmente. O OPG é também uma técnica mais simples e o treinamento consiste basicamente na diferenciação dos ovos das espécies de helmintos. Já a PCR possui passos mais minuciosos e o treinamento é bastante complexo (PAZ E SILVA, 2007).

Em relação à diferenciação dos helmintos, muitas vezes o OPG só provê detecção e contagem dos ovos. Assim como outros métodos baseados na morfologia das formas evolutivas dos parasitas, o diagnóstico pelo OPG tem como limitação o baixo número de caracteres informativos que seriam necessários para a diferenciação entre alguns helmintos (GASSER, 1999). Já a PCR possibilitaria não só a detecção como também a distinção entre os parasitas, sendo assim considerada uma metodologia qualitativa (ZARLENGA e HIGGINS, 2001).

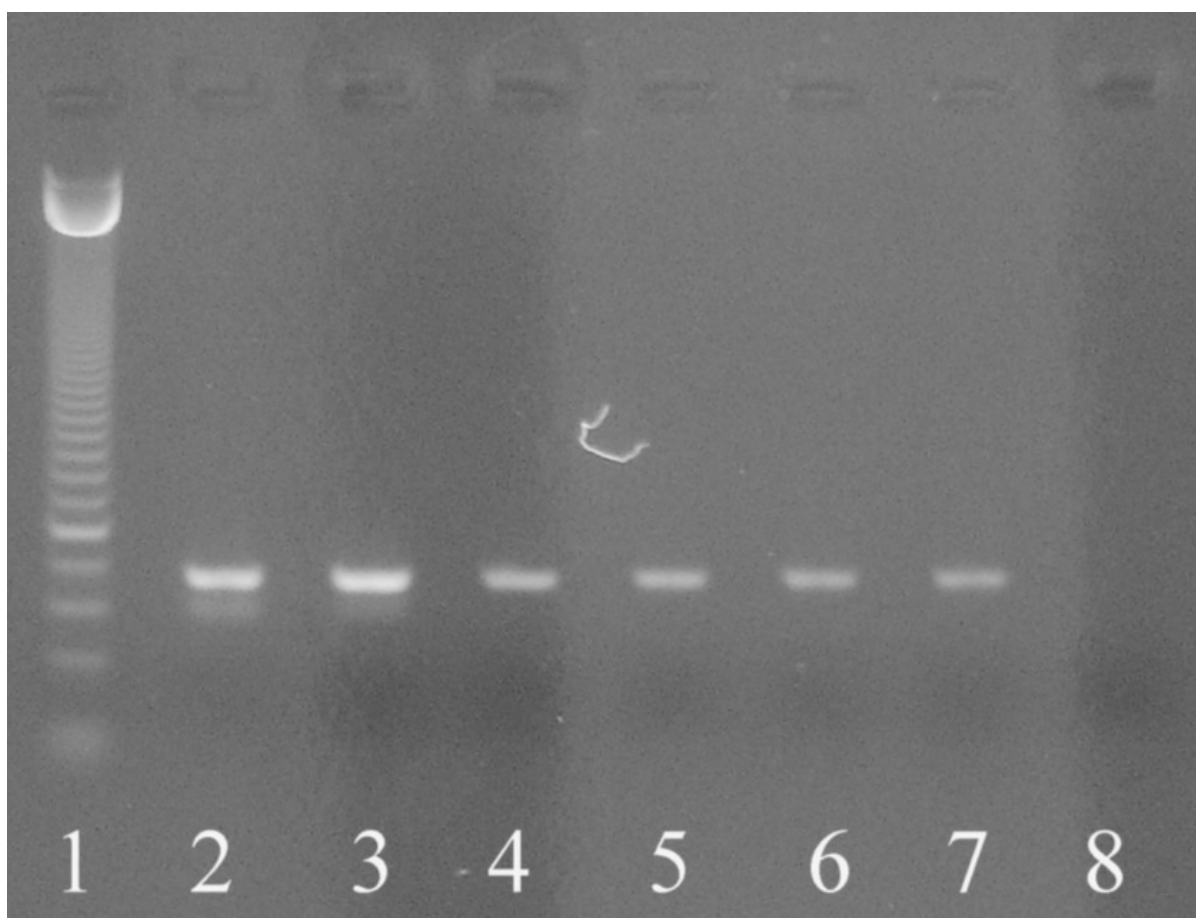


Figura 1. Teste da PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da seqüência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de diferentes concentrações de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 1 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2 a 7 - bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb. Poços 2 e 3 - reações com DNA na concentração de 50ng/ μ l. Poços 4 e 5 - reações com DNA na concentração de 25ng/ μ l. Poços 6 e 7 - reações com DNA na concentração de 12,5ng/ μ l. Poço 8 – reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

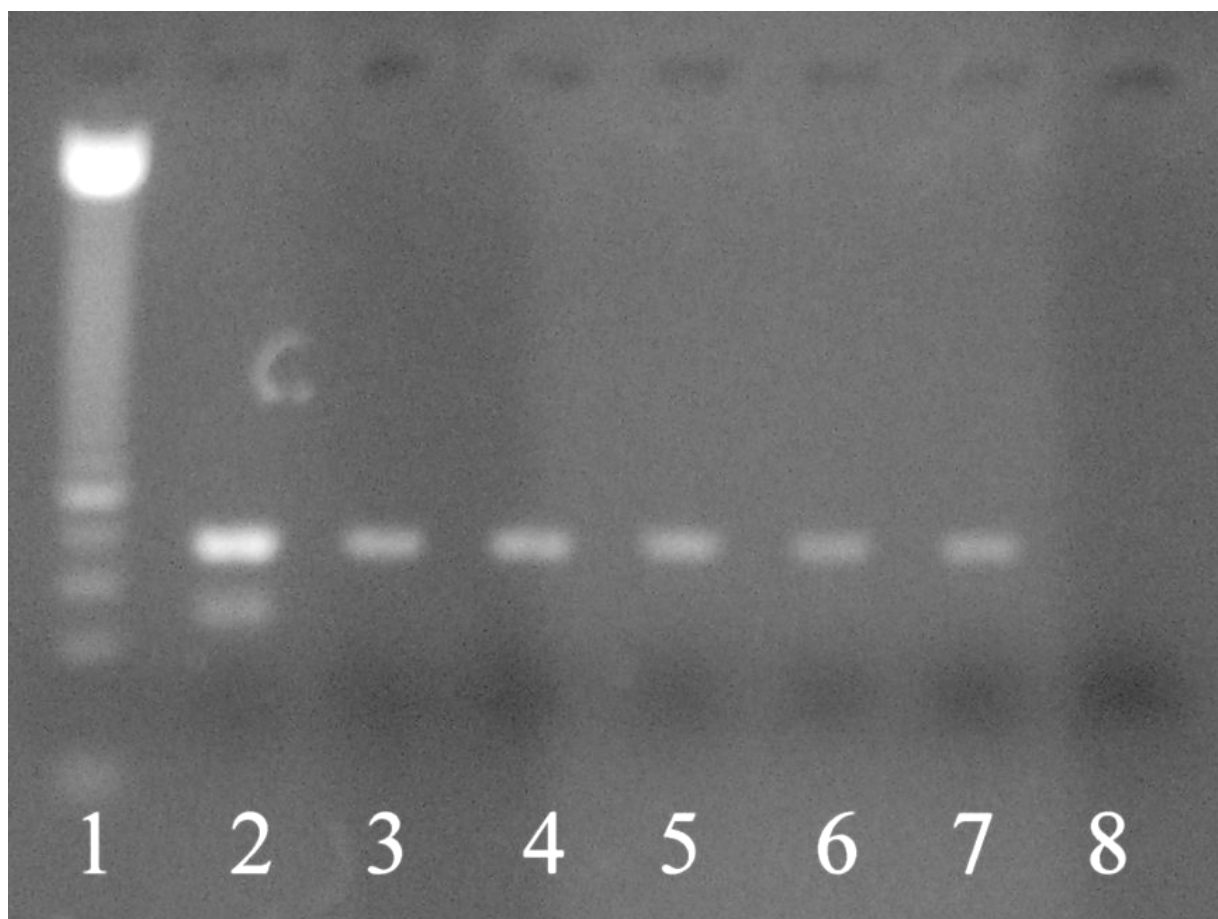


Figura 2. Teste da PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da seqüência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de diferentes concentrações de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 1 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2 a 7 – bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb. Poços 2 e 3 – reações com DNA na concentração de 50ng/ μ l. Poços 4 e 5 - reações com DNA na concentração de 6,25ng/ μ l. Poços 6 e 7 - reações com DNA na concentração de 3,12ng/ μ l. Poço 8 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

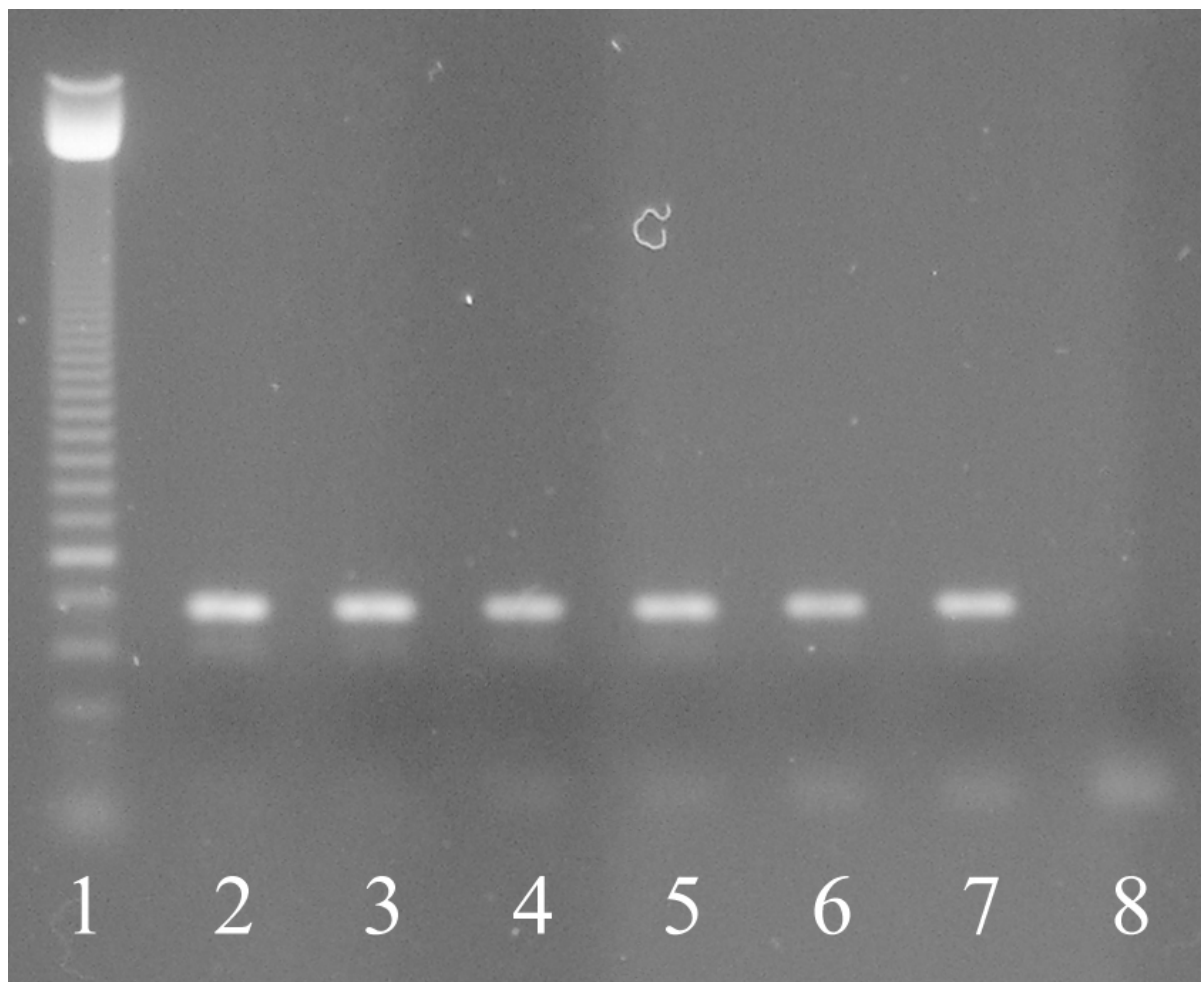


Figura 3. Teste da PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da sequência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de diferentes concentrações de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 1 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2 a 7 – bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb. Poços 2 e 3 – reações com DNA na concentração de 50ng/ μ l. Poços 4 e 5 - reações com DNA na concentração de 1,56ng/ μ l. Poços 6 e 7 - reações com DNA na concentração de 0,78ng/ μ l. Poço 8 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

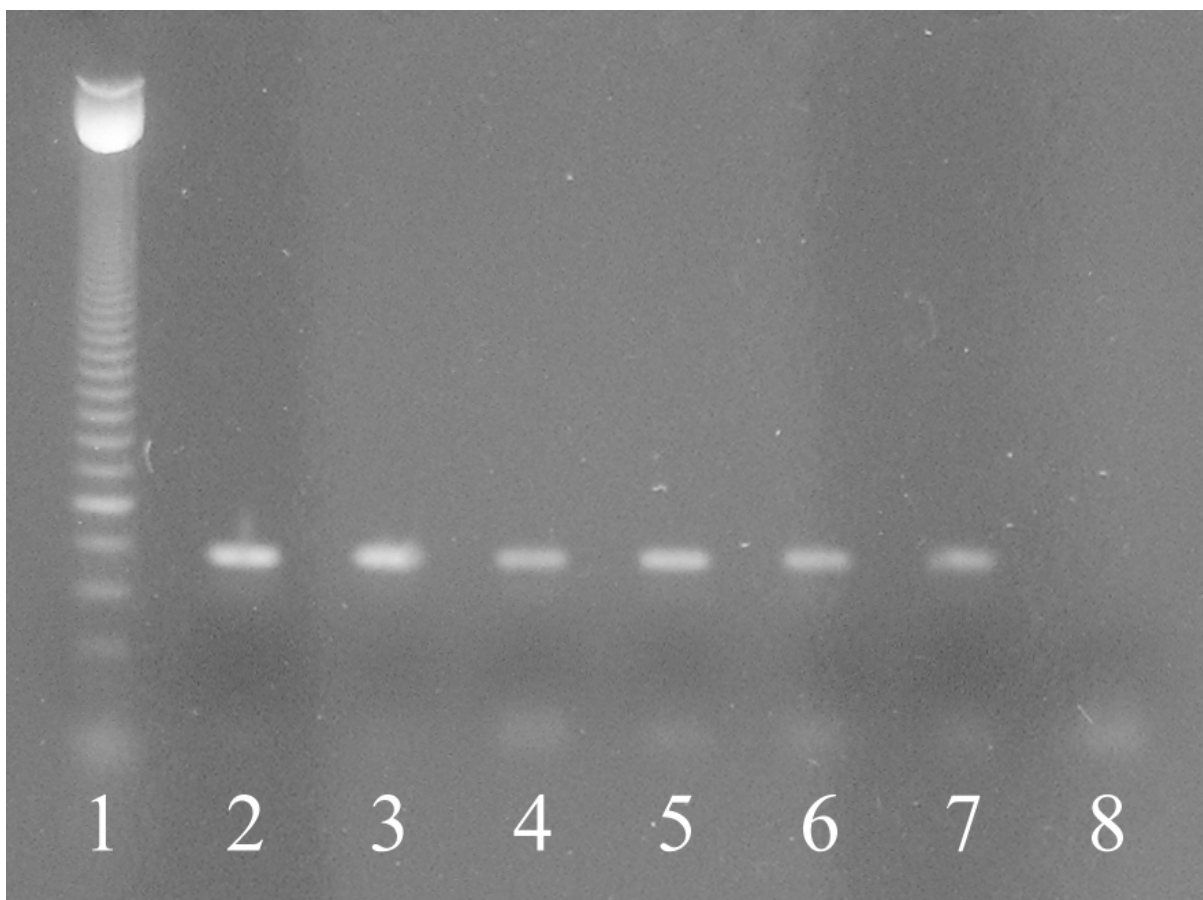


Figura 4. Teste da PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da sequência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de diferentes concentrações de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 1 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2 a 7 – bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb. Poços 2 e 3 – reações com DNA na concentração de 50ng/ μ l. Poços 4 e 5 - reações com DNA na concentração de 0,39ng/ μ l. Poços 6 e 7 - reações com DNA na concentração de 0,195ng/ μ l. Poço 8 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

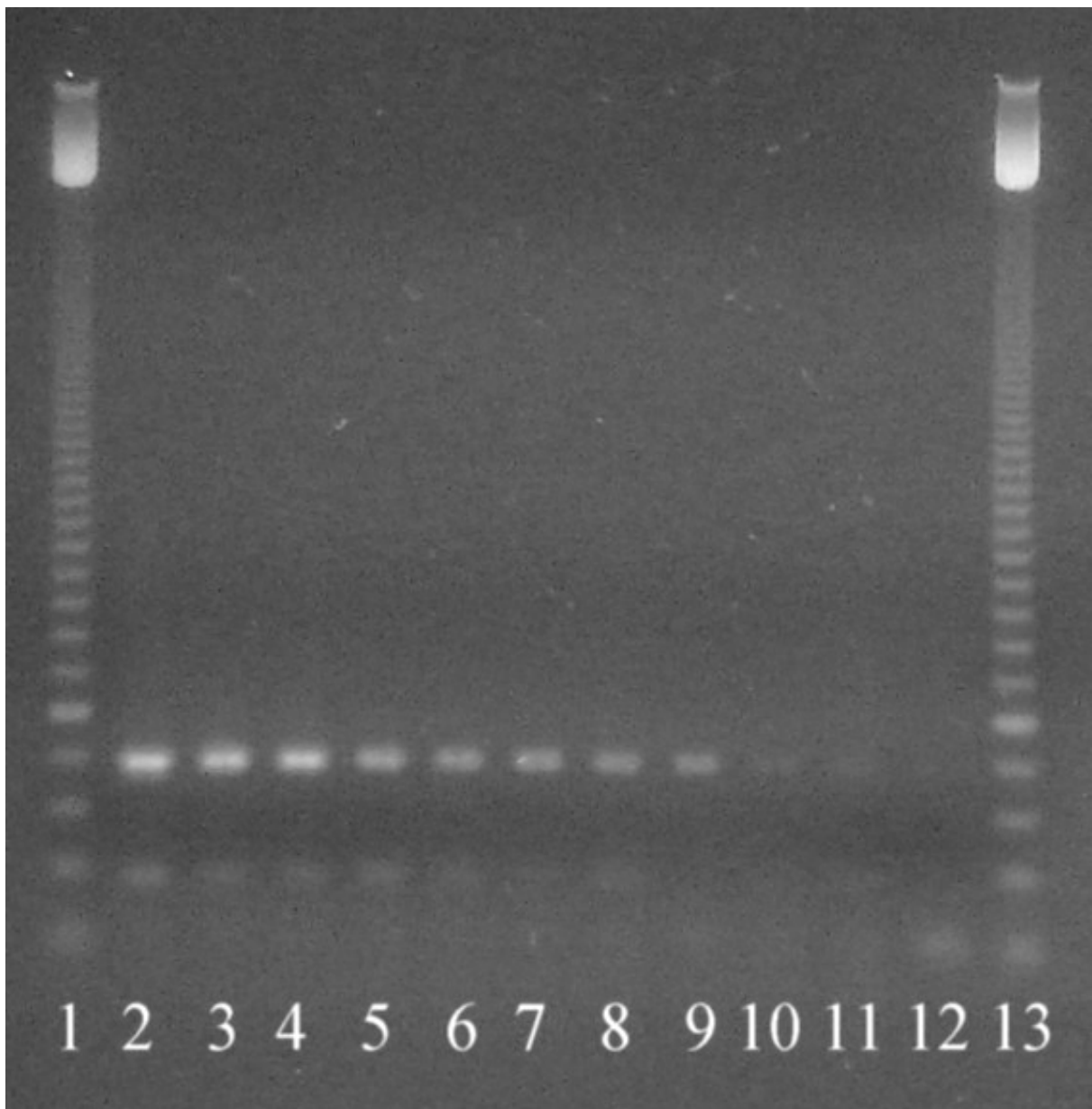


Figura 5. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da sequência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 1 e 2 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 13 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2 a 11- bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb a partir de DNA dos animais N° 1 ao 10. Poço 12 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

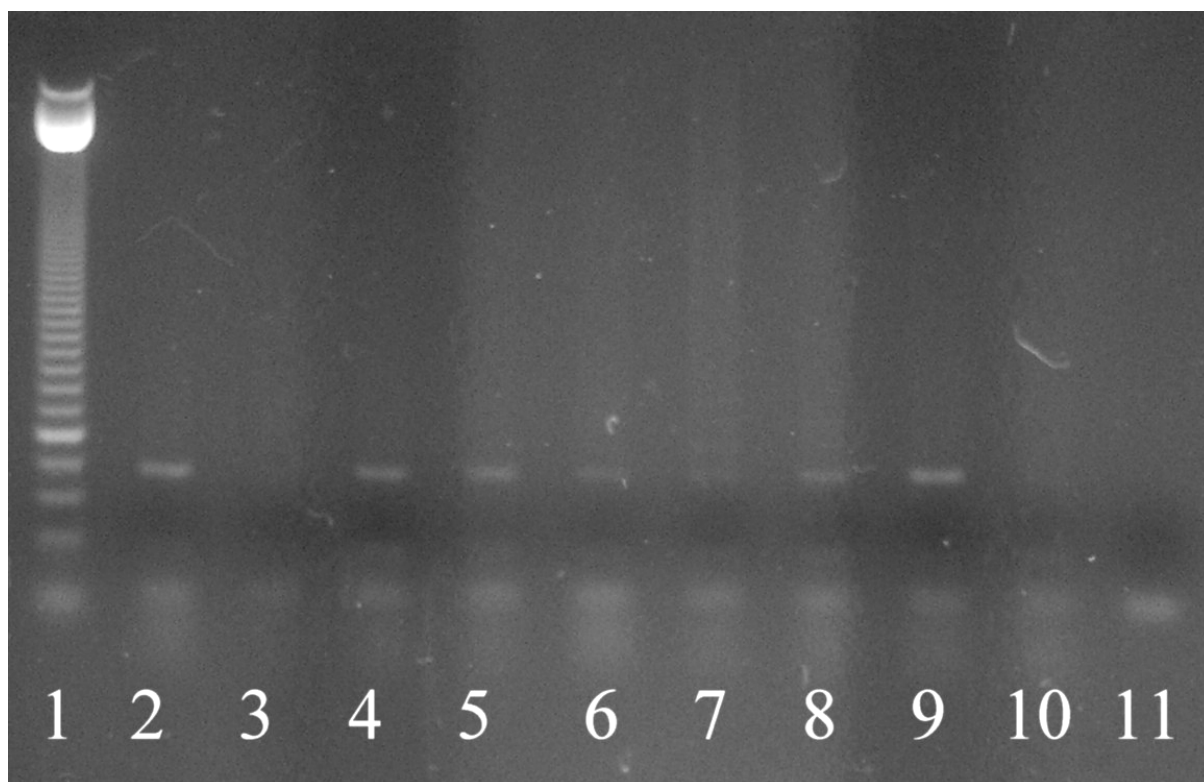


Figura 6. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da sequência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 3 e 4 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poço 1 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poços 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 – bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb a partir de DNA dos animais N° 11, 13, 14, 15, 17, 18 e 19, respectivamente. Poços 3 e 10 – ausência de amplificação na reação com DNA dos animais N° 12 e 20, respectivamente. Poço 10 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

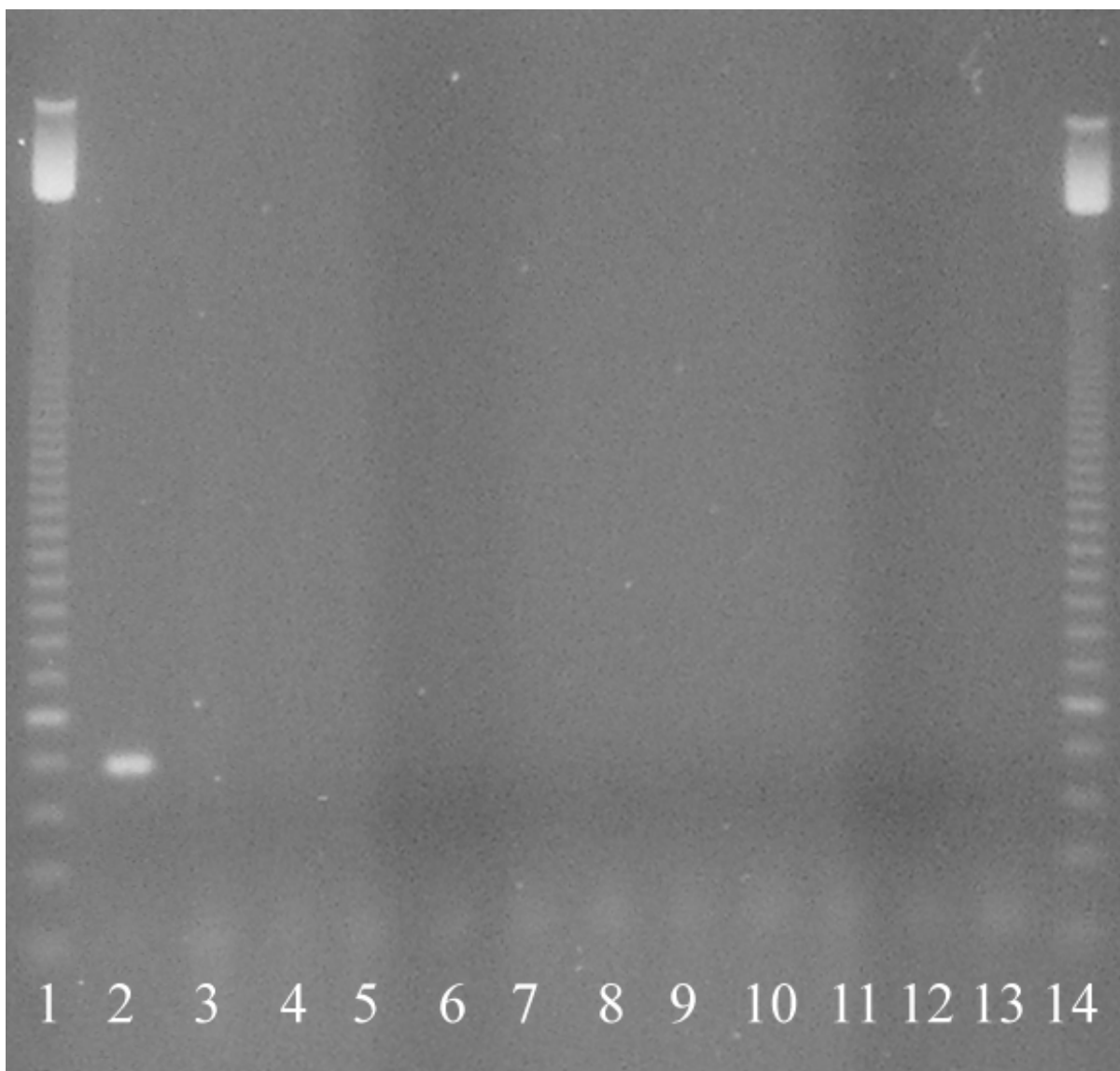


Figura 7. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da seqüência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis* e das fezes de ratos (Grupos 5 e 6 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poço 1 e 14 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 198pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poços 3 ao 12 – ausência de amplificação na reação com DNA dos animais N° 21 ao N° 30. Poço 13 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

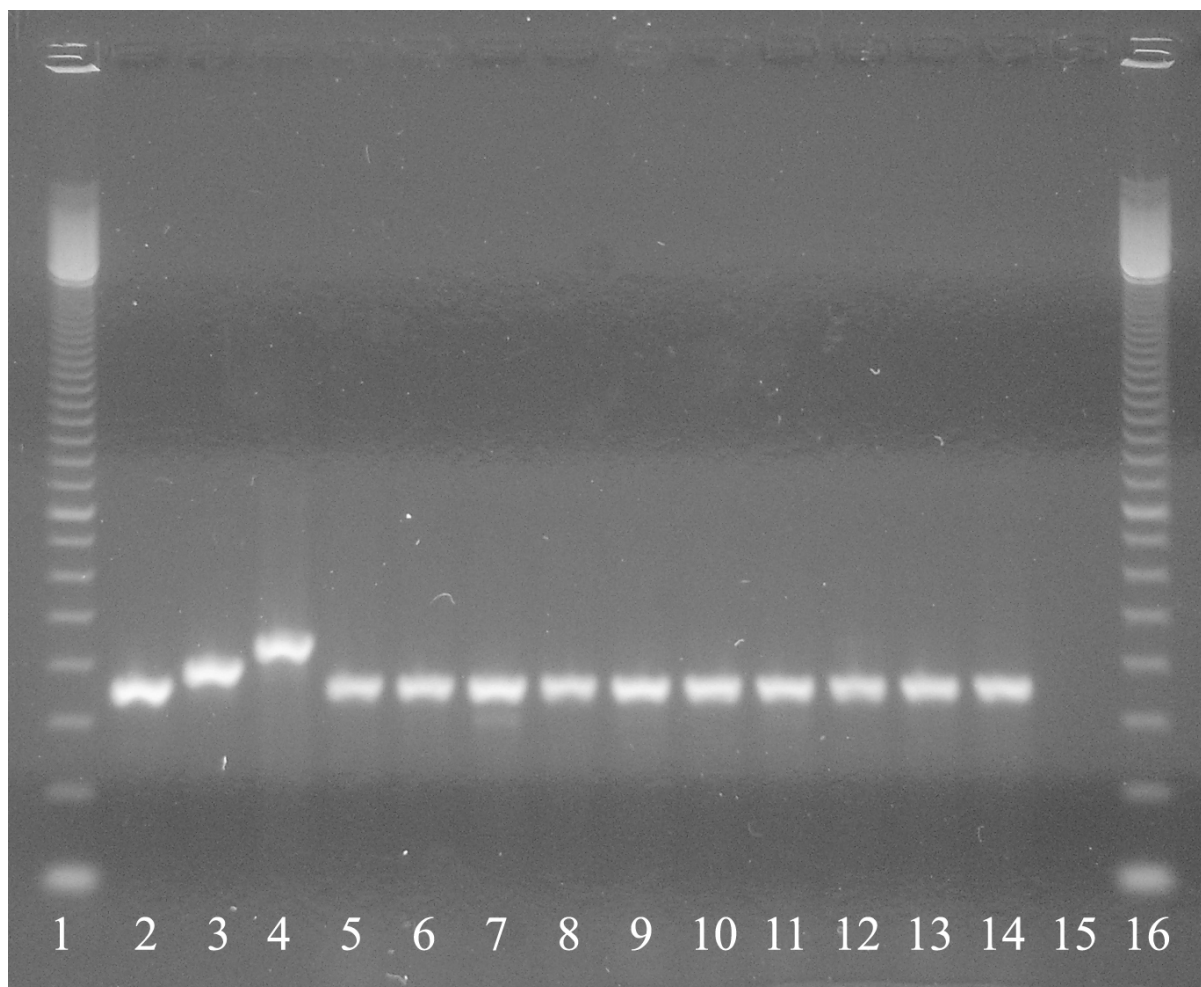


Figura 8. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis* e de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 1 e 2 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 16 - Marcador com 100 pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 - banda de amplificação de aproximadamente 380 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *Syphacia muris*. Poço 4 – banda de amplificação de aproximadamente 420 pb a partir de DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5 a 14 - banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA dos animais N° 1 ao 10. Poço 15 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

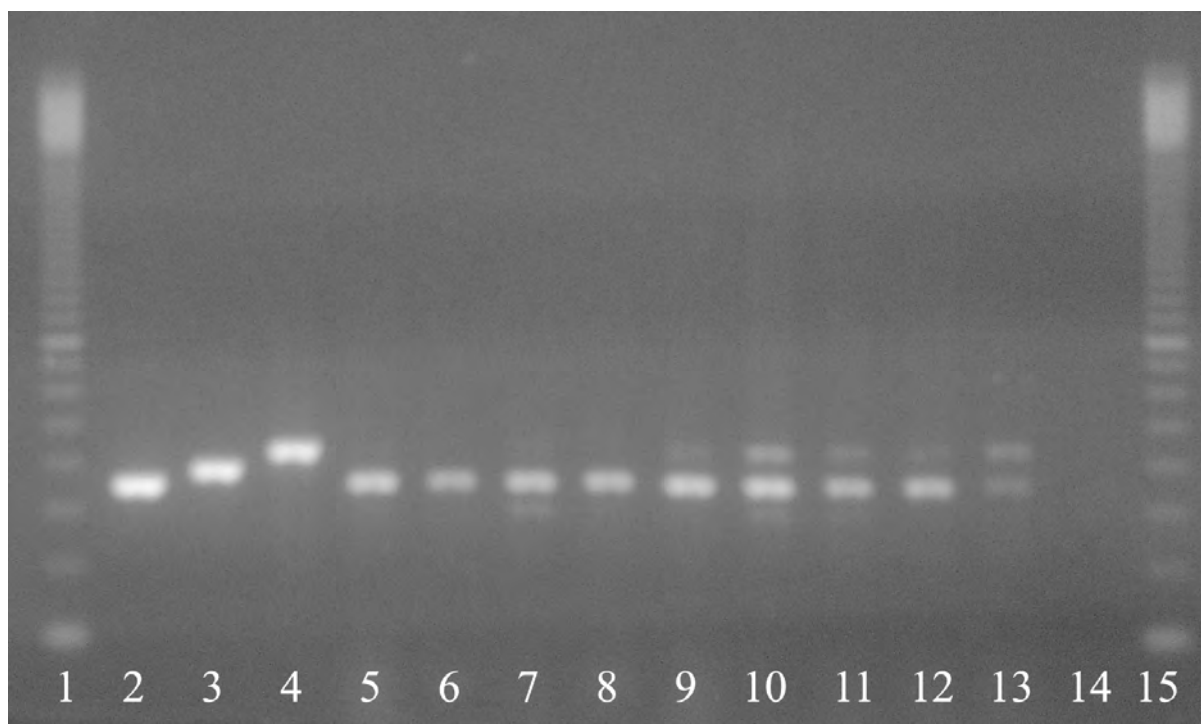


Figura 9. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis* e de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 3 e 4 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 15 - Marcador com 50pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 – banda de amplificação de aproximadamente 380 pb a partir de DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 – banda de amplificação de aproximadamente 420 pb a partir de DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 6 e 8 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA dos animais N° 11, 12 e 14. Poço 7 – banda de amplificação de aproximadamente 320 e 340 a partir de DNA do animal 13. Poços 9, 12 e 13 – bandas de amplificação de aproximadamente 340 e 420 pb a partir de DNA dos animais N° 15, 19 e 20. Poços 10 e 11 - bandas de amplificação de aproximadamente 320, 340 e 420 pb a partir de DNA dos animais N° 17 e 18. Poço 14 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

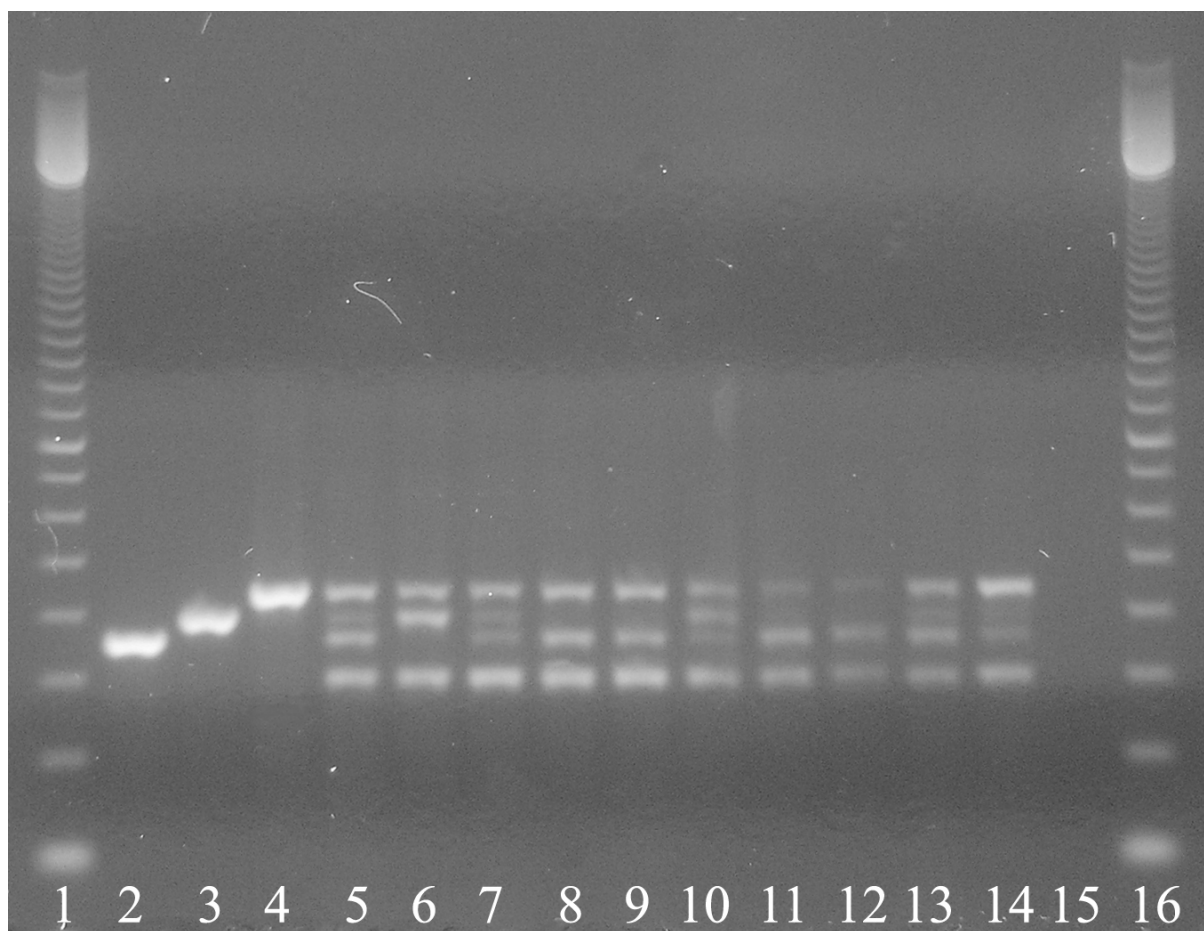


Figura 10. Resultados do Protocolo I. PCR utilizando *primers* genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras de DNA de larvas infectantes de *S. venezuelensis* e de DNA extraído das fezes de ratos (Grupos 5 e 6 do Protocolo I) infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 16 - Marcador com 100pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 – banda de amplificação de aproximadamente 380 pb a partir de DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 – banda de amplificação de aproximadamente 420 pb a partir de DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 7, 10, 13, 14 - bandas de amplificação de aproximadamente 320, 340, 380 e 420 pb a partir de DNA dos animais N° 21, 23, 26, 29 e 30. Poço 6 - bandas de amplificação de aproximadamente 320, 380 e 420 a partir de DNA do animal N° 22. Poços 8, 9, 11 e 12 - bandas de amplificação de aproximadamente 320, 340 e 450 pb a partir de DNA dos animais N° 24, 25, 27 e 28. Poço 15 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

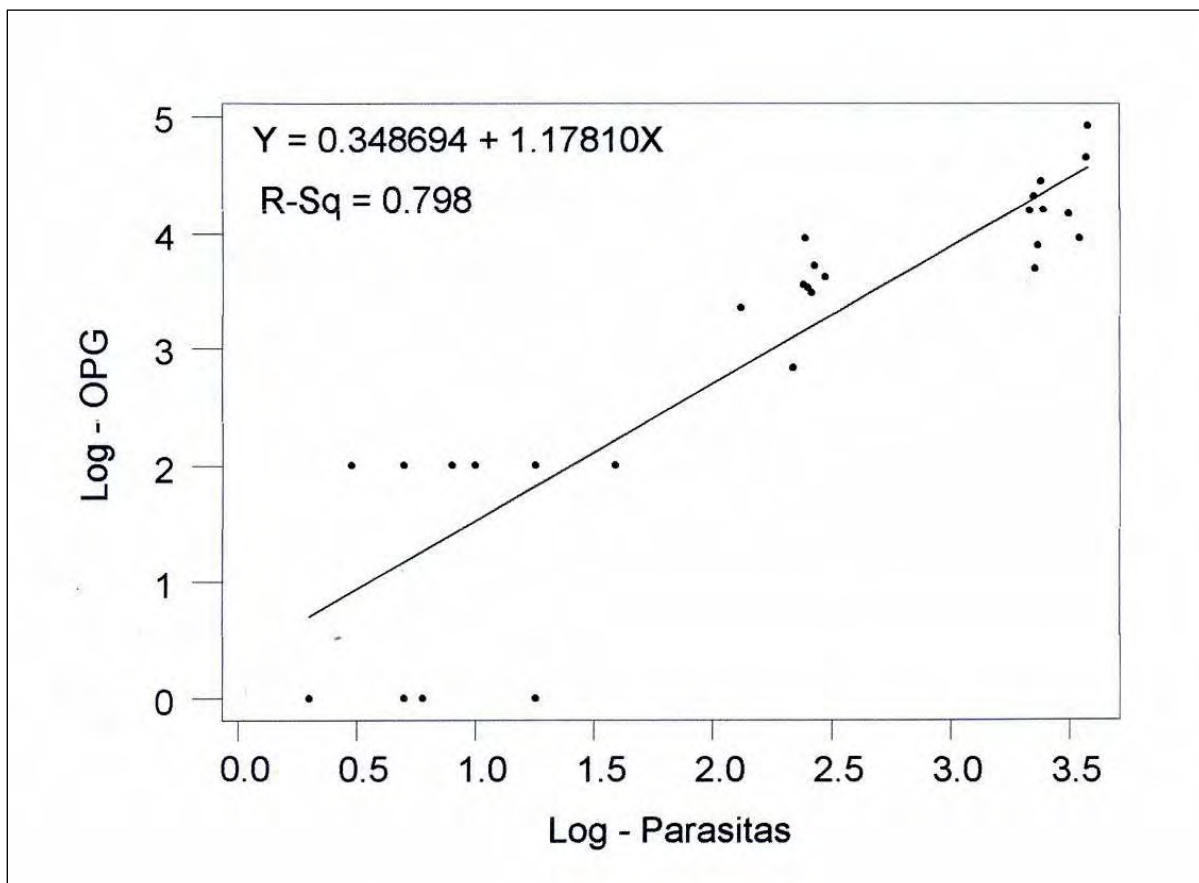


Figura 11. Relação entre OPG, número de parasitas recuperados do intestino delgado e tipos inóculos (4000, 400 e 40 larvas infectantes de *S. venezuelensis*) utilizados para infectar ratos (macho e fêmea) da linhagem Lewis (Protocolo I).

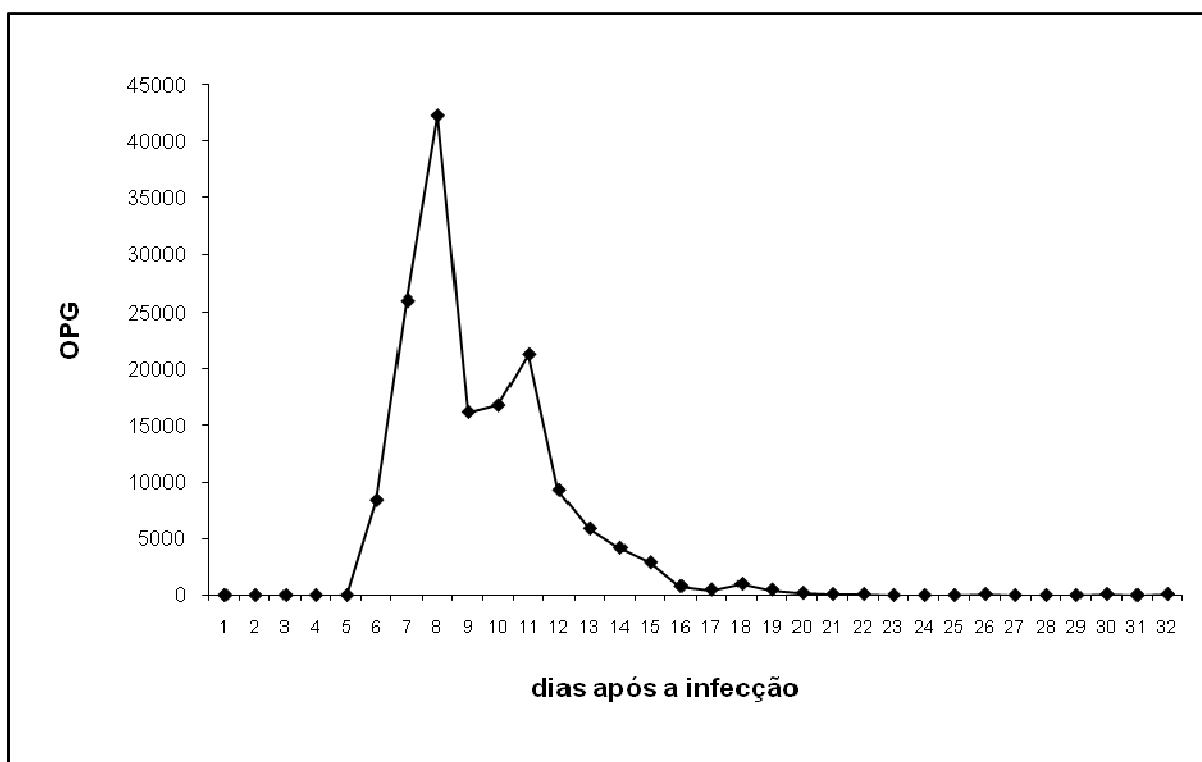


Figura 12. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) em amostras fecais obtidas dos animais do grupo Fase de Eliminação da Infecção, infectados com 4000 larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis*.

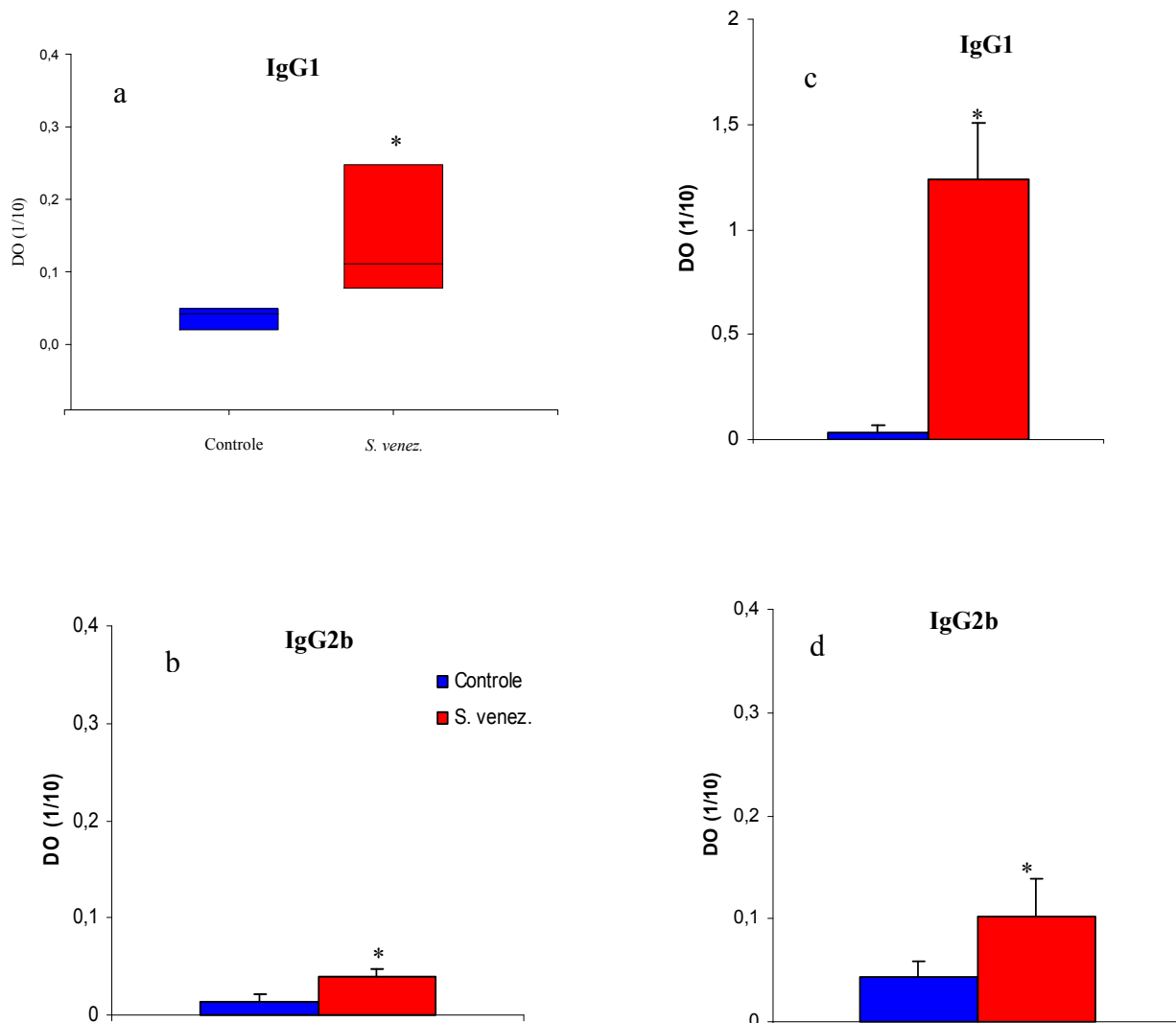


Figura 13. Produção de anticorpos em ratos Lewis infectados com *S. venezuelensis*: fase aguda (a e b) e fase recuperação (c e d). Os resultados da produção de IgG1(a) na fase aguda representam a mediana (25-75%) de 5 animais por grupo. Os resultados da produção de IgG1 (c) na fase recuperação e IgG2b (b e d) em ambas as fases representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

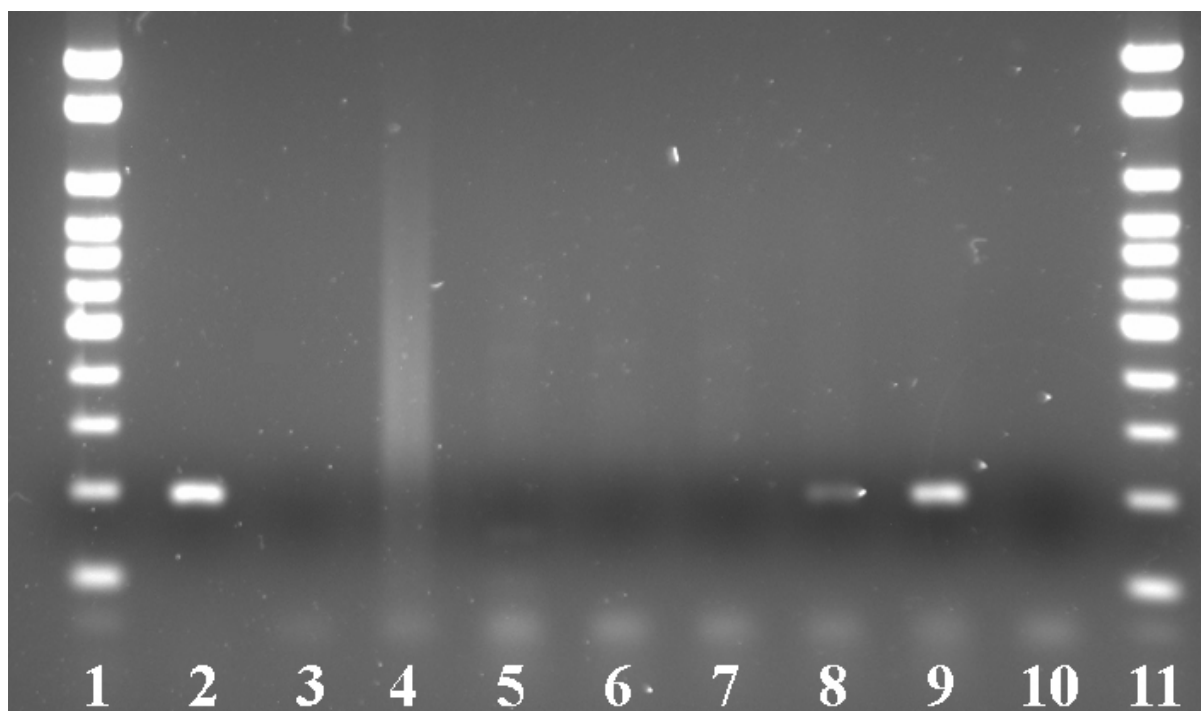


Figura 14. Resultados da Fase Aguda do Protocolo II. PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da seqüência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de DNA extraído das fezes de ratos infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 11 - Marcador com 100pb (Amersham Biosciences). Poço 2 - banda de amplificação de aproximadamente 198pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 6 e 7 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído das fezes dos animais 0, 2 e 4 dias após a infecção. Poços 8 e 9 - bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 6 e 8 dias após a infecção. Poço 10 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

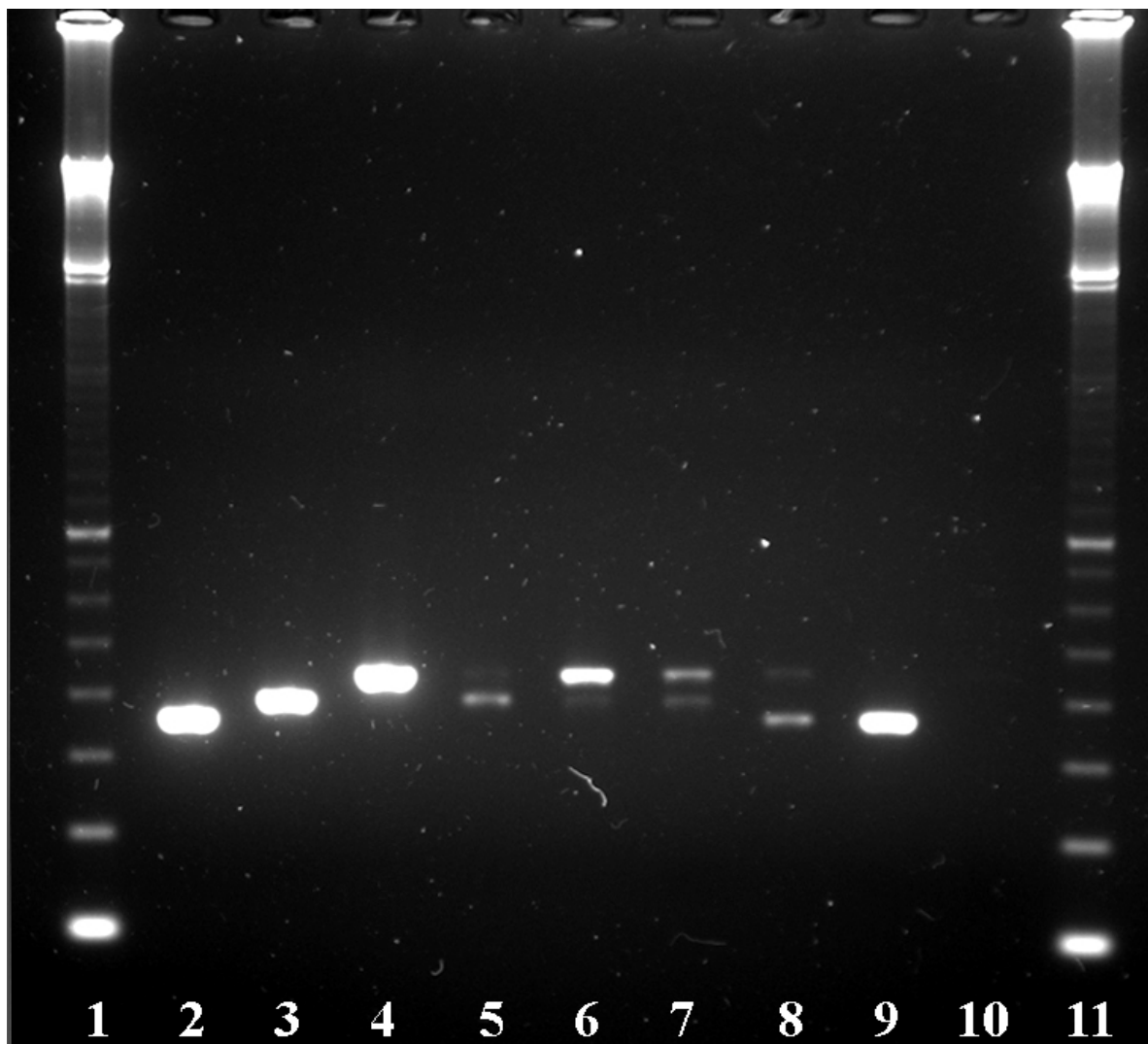


Figura 15. Resultados da Fase Aguda do Protocolo II. PCR utilizando *primers* genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras de DNA extraído das fezes de ratos infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 11 - Marcador com 100pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 – banda de amplificação de aproximadamente 380 pb a partir de DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 – banda de amplificação de aproximadamente 420 pb a partir de DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 6 e 7 - bandas de amplificação de aproximadamente 380 e 420 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 0, 2 e 4 dias após a infecção. Poço 8 - bandas de amplificação de aproximadamente 340 e 420 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 6 dias após a infecção. Poço 9 - banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 8 dias após a infecção. Poço 10 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

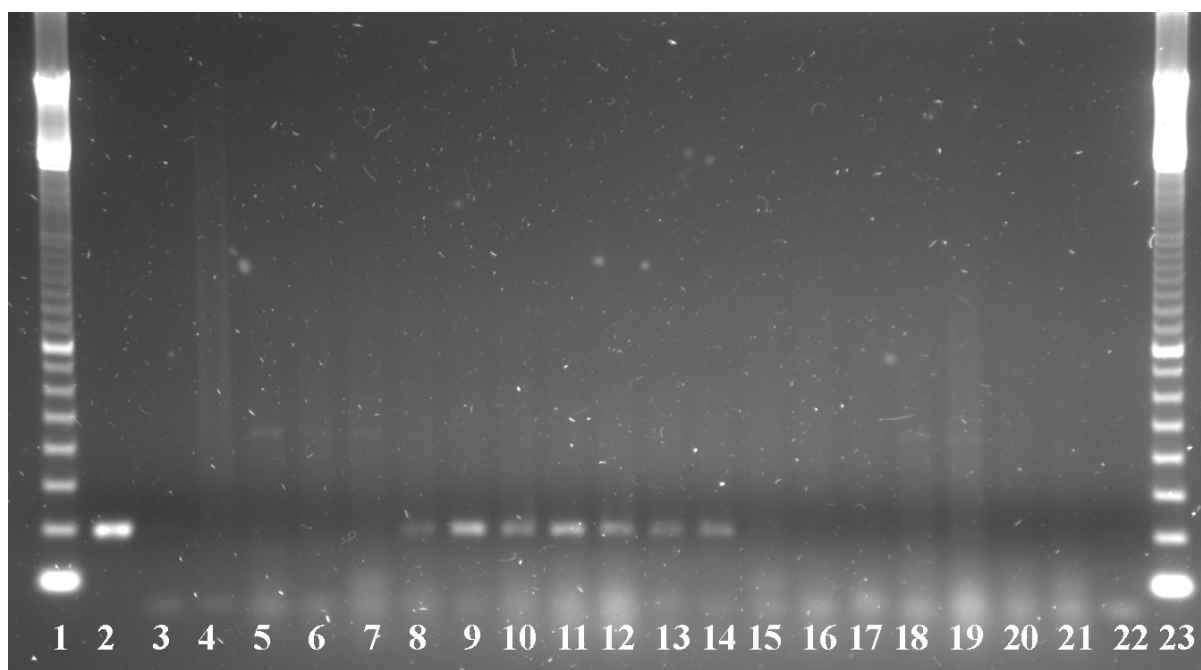


Figura 16. Resultados da Fase de Eliminação da Infecção do Protocolo II. PCR utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial da seqüência de rDNA de *Strongyloides venezuelensis* em amostras de DNA extraído das fezes de ratos infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 23 - Marcador com 100pb (Amersham Biosciences). Poço 2 - banda de amplificação de aproximadamente 198pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 6, 7 e 15 ao 21 - ausência de amplificação na reação com DNA extraído das fezes dos animais 0, 2, 4, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 dias após a infecção. Poços 8 ao 14 - bandas de amplificação de aproximadamente 198 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dias após a infecção. Poço 22 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

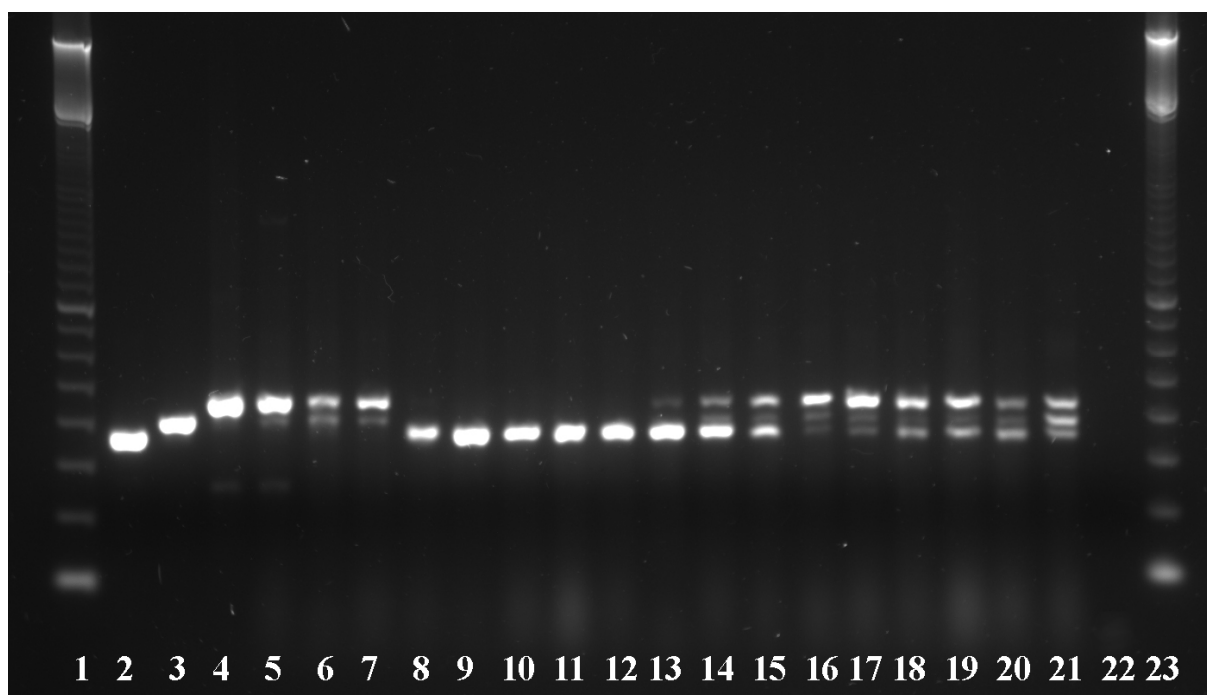


Figura 17. Resultados da Fase de Eliminação da Infecção do Protocolo II. PCR utilizando *primers* genéricos (DORRIS et al., 2002) a partir de amostras de DNA extraído das fezes de ratos infectados por *S. venezuelensis*. Poços 1 e 23 - Marcador com 100pb (Amersham Biosciences). Poço 2 – banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Poço 3 – banda de amplificação de aproximadamente 380 pb a partir de DNA extraído de adultos de *Syphacia muris*. Poço 4 – banda de amplificação de aproximadamente 420 pb a partir de DNA extraído de baço de rato não infectado. Poços 5, 6 e 7 - bandas de amplificação de aproximadamente 380 e 420 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 0, 2 e 4 dias após a infecção. Poços 8 ao 12 - banda de amplificação de aproximadamente 340 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 6, 8, 10, 12 e 14 dias após a infecção. Poço 13 - bandas de amplificação de aproximadamente 340 e 420 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 16 dias após a infecção. Poço 14 ao 21 - bandas de amplificação de aproximadamente 340, 380 e 420 pb a partir de DNA extraído das fezes dos animais 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 dias após a infecção. Poço 22 - reação contendo somente reagentes (sem adição de qualquer DNA).

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A PCR com a utilização do par de *primers* genérico descrito por Dorris et al. (2002) foi de grande utilidade para a detecção de DNA de *Strongyloides venezuelensis* nas fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis.
- A PCR é mais sensível que o OPG, principalmente quando a inoculação é baixa (Protocolo I) ou quando a infecção torna-se leve (Protocolo II).
- A PCR constitui-se em importante ferramenta para o monitorar e diagnosticar animais infectados experimentalmente com diferentes cargas parasitárias.
- A infecção por *S. venezuelensis* em ratos da linhagem Lewis possui período pré-patente de seis dias e perdurou até o 32º dia após a infecção (com a detecção de fêmeas no intestino delgado e de ovos nas fezes).
- A infecção por *S. venezuelensis* apresentou dois picos de eliminação de ovos, no oitavo e 11º dias, sendo o primeiro o maior deles, ou seja, a dinâmica da infecção em ratas Lewis é semelhante à de ratos da linhagem Wistar e Sprague-Dawley em que o maior pico de eliminação de ovos ocorreu entre o sétimo e o nono dias após infecção.

PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta metodologia poderia ser empregada em animais de produção como uma alternativa para o diagnóstico precoce de animais com carga parasitária leve e que não apresentam sintomatologia. Poderia, ainda, ser utilizada em consórcio com metodologias preventivas ou de controle, de modo a evitar que infecções leves se tornassem crônicas ou severas. A PCR das fezes também poderia ser utilizada para identificação de espécies de parasitas em rebanhos, contribuindo para a utilização de medidas específicas de controle.

Adicionalmente, o emprego da PCR poderia ser útil na detecção de espécies do gênero *Strongyloides* em outros hospedeiros. Um exemplo seria a detecção de carga parasitária leve de *S. stercoralis* em pacientes humanos a serem submetidos a transplantes de órgãos. Seria importante detectar o parasita e realizar tratamento, pois quando esses pacientes fossem submetidos a imunossupressores uma infecção leve poderia evoluir para um quadro de hiperinfecção e ainda para a forma disseminada de strongiloidíase. Essa técnica poderia ser utilizada como uma alternativa ao método parasitológico, a fim de aumentar a sensibilidade na detecção de infecção crônica e assintomática.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, C.R. *Aplicação de genética molecular para diagnóstico de neurocisticercose e descoberta gênica em Taenia solium*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

AMARANTE, A.F.T., OLIVEIRA-SIQUEIRA, T.C.G. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.273-278, 2002.

AMATO NETO, V. et al. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*, através da ivermectina administrada por via oral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.30(6), p.481-484, 1997.

ANDERSEN, M.L. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. 1.ed. São Paulo: UNIFESP, 2004. p.81-119.

ANURADHA, P.A.L.R.; KATIYAR, J.C. Sex influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamsters. *Indian J. Exp. Biol.*, v.28, p.876-879, 1990.

ARRIAGA, C. et al. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *J. Parasitol.*, v.81, p. 781-783, 1995.

BAEK, B.K. et al. Partial cross-resistance *Strongyloides venezuelensis* and *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Korean J. Parasitol.*, v.37, p.101-107, 1999.

BAEK, B.K. et al. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Vet. Parasitol.*, v.113, p.217-227, 2003.

BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindun von Ankylostomun (nematoden) larven in erdproben mededeel. *Mit H Geneesk Lab Weltvreden Feestbundel Batavia*, p. 41-47, 1917.

- BEAVER, P.C.; JUNG, R.C.; *Animals agents and vectors of human disease*. 5.ed., Philadelphia, USA: Lea & Febiger, p.155-159, 1985.
- BEHNKE, J.M. et al. Mapping the genes for resistance to gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitol.*, v.45, p.1-13, 2000.
- BEHNKE, J.M. et al. Chasing the genes that control resistance to gastrointestinal nematodes. *J. Helmintol.*, v.77, p.99-109, 2003.
- BELLABY, K. et al. Isolates of *Trichuris muris* vary in their ability to elicit protective immune responses to infection in mice. *Parasitology*, v.111, p.353-357, 1995.
- BOWMAN, D.D. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 8 ed. São Paulo: Manole, p.197-201, 2006.
- CODY, R.P., SMITH, J.K. *Applied Statistics and the SAS® Programming Language*. 15 ed. Pearson Education, Inc., 2006.
- COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D.P. (Ed). *Parasitologia Humana*. 11.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p.275-284.
- DAWKINS, H.J.S. *Strongyloides ratti* infections in rodents: value and limitations as a model for human strongyloidiasis. In: GROVED, D.I. (Eds.) *Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man*. London: Taylor & Francis, 1989. p.287-332.
- DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica*. Ed. Atheneu, 2001.
- DE PAULA, F.M. *Caracterização do complexo proteolítico proteassoma em Strongyloides venezuelensis*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- DE VEER, M.J. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunol.*, v.29, p.1-9, 2007.

DINKEL, A. et al. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the Definitive Host: Coprodiagnosis by PCR as an Alternative to Necropsy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p.1871-1876, 1998.

DORRIS, M., VINEY, M. E., BLAXTER, M. L. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.1507-1517, 2002.

DOUCH, P.G.C. et al. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int. J. Parasitol.*, v.26, p.899-911, 1996.

EL-MALKY, M. et al. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol. Int.*, v.52, p.71-79, 2003.

FERREIRA, M.S. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R. (Ed). *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.856-865, 1991.

GASSER, R.B. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.*, v.84, p.229-258, 1999.

GAULY, M. et al. Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, v.113, p.178-181, 2006.

GEMMILL, A.W.; WEST, S.A. Influence of rat strain on larval production by the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *J.Parasitol.*, v.84, p.1289-1291, 1998.

GILIOLI, R. et al. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.1, 2000.

GOYAL, P.K.; WAKELIN, D. Influence of variation in host strain and parasite isolate on inflammatory and antibody responses to *Trichinella spiralis* in mice. *Parasitology*, v.106, p.371-378, 1993.

GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. S. Ind. Res.*, v.12, p.50-52, 1939.

GROSMANN, C.J. et al. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, v.40, p.649-659, 1991.

HARKNESS, J.E. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3.ed. Roca, p.238, 1993.

ISLAM, M.K. et al. Effects of in vitro culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. *Korean J. Parasitol.*, v.37, p.13-19, 1999.

KAMIS, A.B.; AHMAD, R.A.; BADRUL-MUNIR, M.Z. Worm burden and leukocyte response in *Angiostrongylus malaysiensis*-infected rats: the influence of testosterone. *Parasitol Res.*, v.78, p.388-391, 1992.

KATZ, N.; CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.14, p.397-400, 1972.

KEISER, P.B., NUTMAN, T.B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, p.208-217, 2004.

KHAN, A.I. et al. Mucosal mast cells and the expulsive mechanism of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *J. Helminthol.*, v.23, p.551-555, 1993.

KIMURA, K. et al. A second peak of egg excretion in *Strongyloides ratti*-infected rats: its origin and biological meaning. *Parasitology.*, v.119, p.221-226, 1999.

KIMURA, K. et al. Interleukin-3 and Kit/stem cell factor are required for normal eosinophil responses in mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Lab. Invest.*, v.86, p.987-996, 2006.

- KLEIN, S.L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.*, v.26, p.247-264, 2004.
- LY, M.N. et al. Cutaneous *Strongyloides stercoralis* infection: An unusual presentation. *J Am Acad Dermatol.*, v.49, p.157-160, 2003.
- LUNA, O.B. et al. Estrongiloidíase disseminada: diagnóstico e tratamento. *Rev. Bras. Terap. Intensiva*, v.19, p.463-468, 2007.
- MACHADO E.R. et al. *Strongyloides venezuelensis* Alkaline Extract for the Diagnosis of Human Strongyloidiasis by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98(6), p.849-851, 2003.
- MACHADO E.R. et al. Comparison of immune response in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasite Immunol*, v.29 p.549-557, 2007.
- MARUYAMA, H., NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. *Exp. Parasitol.*, v.85, p.10-15, 1997.
- MARUYAMA, H. et al. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol.*, v.22, p.279-286, 2000.
- MARUYAMA, H. et al. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology.*, v.132, p.1-8, 2006.
- MATHIS A., DEPLAZES, P. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitology*, v.55, p.S87-S90, 2006.
- MATSUDA, K. et al. Migration of *Strongyloides venezuelensis* in rats after oral inoculation of free-living infective larvae. *J. Vet. Med. Sci.*, v.65, p.971-975, 2003.
- MORALES-MONTOR, J. et al. Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *J. Parasitol.*, v.90, p.531-546, 2004.

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

NAKAI, E.S., AMARANTE, A.F.T. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.10, p.1-6, 2001.

NAKANISHI, H. Difference in the susceptibility to *Brugia pahangi* infection between male and female BALB/c mice: Differences of effector cell responses between sex. *Trop. Med.*, v.29, p.153-163, 1987.

NAKANISHI H. et al. Effect of testosterone on the susceptibility of C57BL/6 mice to infection with *Brugia pahangi* with reference to inflammatory cell response. *J. Parasitol.*, v.75, p.455-460, 1989.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.43, p.291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* infected mice. *Infect. Immunol.*, v.72, p.1135-1142, 2004.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Expression of IL-4 receptor on bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *Int. J. Parasitol.*, v.36, p.1185-1195, 2006.

OLIVEIRA, T.C.G., AMARANTE, A.F.T. Dynamics of *Strongyloides venezuelensis* infection and relationship between fecal egg counts and parasite burden in swiss mice. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.23, p.99-102, 2001.

ONAH, D.N. et al. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease 1 during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcR γ -Knockout mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.4968-4971, 2000.

ONAH, D.N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean. J. Parasitol.*, v.38, p.209-236, 2000.

PAZ E SILVA, F.M. *Diagnóstico e caracterização molecular de Giardia duodenalis e Cryptosporidium spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

PEDRAZA, R.A.M. *Frequência de infecção por Strongyloides stercoralis no Chile: detecção da parasitose mediante métodos parasitológicos e soropidemiológicos*. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004

PINTO, R.M. et al. Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.133-136, 2001.

PONTES, L.A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.68, p.652-656, 2003.

PRITCHETT, K.R. *The Mouse in Biomedical Research*. 2. ed. Elsevier Inc., p. 554, 2007.

REY, L. *Parasitologia*. 3ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.856, 2001.

RIVERO J.C. et al. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 64, p. 457-461, 2002.

RODRIGUES, R.M. et al. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitol Res.*, v.101, p. 1209-1214, 2007.

ROSSI, C.L. et al. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v.35, p. 361-365, 1993.

ROZEN, S., SKALETSKY, H.J., Primer3 on WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S., MISENER, S., *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Totowa, Estados Unidos: Human Press, p.365-386, 2000.

RUANO, A.L. et al. Avances en el estudio sobre la estrongiloidosis. *Enf. Emerg.*, v.7(2), p. 102-109, 2005.

RUGAI E., MATTOS, T., BRISOLA, A.P., Nova técnica para isolar larvas de nematódeos das fezes. Modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, v. 14, p. 5-8, 1954.

SANDOVAL, N. et al. *Schistosoma mansoni*: A diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp. Parasitol.*, v.114, p.84-88, 2006.

SASAKI, Y. et al. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J. Exp. Med.*, v.202, p.607-616, 2005.

SATO, Y., TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Int. J. Parasitol.*, v.20, p.57-62, 1990.

SATOU, T. et al. Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. *Vet. Parasitol.*, v.99, p.311-322, 2001.

SATOU, T. et al. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. *Vet. Parasitol.*, v.104, p.131-138, 2002.

SHINTOKU, Y. et al. *Strongyloides ratti* infection in the large intestine of wild rats, *Rattus norvegicus*. *J. Parasitol.*, v.91, p.1116-1121, 2005.

SIDDIQUI, A.A., BERK, S.L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin. Infect. Dis.*, v.33, p.1040-1047, 2001.

SILVEIRA, M.R. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect. Immunol.*, v.70, p.6263-6272, 2002.

SOLOMON, M.S.; HALEY, A.J. Biology of the rat nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). Characteristics of *N. brasiliensis* after serial passage in the laboratory mouse. *J. Parasitol.*, v.52, p.237-241, 1966.

TAIRA, N. et al. Massive experimental infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats and absence of sudden death. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 57, p.855-858, 1995.

TAMURA, N. Studies on availability of *Strongyloides venezuelensis* for experimental model of strongyloidosis. *Bul. Nip. Vet. A. Sci.*, p.94.96, 1993.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *Int. J. Parasitol.*, v.25, p.907-911, 1995.

TINDALL, N.R.; WILSON, P.A. Criteria for a proof of migration routes of immature parasites inside hosts exemplified by studies of *Strongyloides ratti* in the rat. *Parasitology*, v.96, p.551-563, 1988.

TOE, L. et al. Detection of *Onchocerca volvulus* infection by O-150 Polymerase Chain Reaction analysis of skin Scratches. *J. Infect. Dis.*, v.178, p.282-285, 1998.

UENO, H., GUTIERREZ, V.C. *Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Rumiantes*. Tóquio, Japão, 1983.

- URQUHART, G.M. et al. *Parasitol. Vet.*, 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1998. 273p.
- VADLAMUDI, R.S. et al. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin. Mol. Allergy*, v.4, p.1-13, 2006.
- VICENTE, J.J. et al. Nematódeos do Brasil. Parte V: Nematódeos de mamíferos. *Rev. Bras. Zool.*, v.14, suppl. 1, p.1-452, 1997.
- VINEY, M. How do host immune responses affect nematode infections? *Trend Parasitol.*, v.18, p.63-65, 2002.
- WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.8, p.113-130, 1995.
- WILKES, C.P. et al. The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats. *Parasite Immunol.*, v.29, p.339-346, 2007.
- WIMMER, B. et al. Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int. J. Parasitol.*, v.34, p.625-631, 2004.
- WONGRATANACHEEWIN, S. et al. Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. *Parasitology*, v.122, p.175–180, 2001.
- ZARLENGA D.S., HIGGINS J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.*, v.101, p.215–230, 2001.
- ZUCK, M., MCKEAN, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. Parasitol.*, v.26, p.1009-1024, 1996.

Tabela 1. Teste da PCR em amostras com diferentes concentrações de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis* utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial do rDNA de *Strongyloides venezuelensis*.

Poços	Tamanho de banda
1. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
2. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
3. DNA larval (25ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
4. DNA larval (25ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
5. DNA larval (12,5ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
6. DNA larval (12,5ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
7. Reagentes (sem DNA)	Sem amplificação

Tabela 2. Teste da PCR em amostras com diferentes concentrações de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis* utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial do rDNA de *Strongyloides venezuelensis*.

Poços	Tamanho de banda
1. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
2. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
3. DNA larval (6,25ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
4. DNA larval (6,25ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
5. DNA larval (3,12ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
6. DNA larval (3,12ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
7. Reagentes (sem DNA)	Sem amplificação

Tabela 3. Teste da PCR em amostras com diferentes concentrações de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis* utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial do rDNA de *Strongyloides venezuelensis*.

Poços	Tamanho de banda
1. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
2. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
3. DNA larval (1,56ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
4. DNA larval (1,56ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
5. DNA larval (0,78ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
6. DNA larval (0,78ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
7. Reagentes (sem DNA)	Sem amplificação

Tabela 4. Teste da PCR em amostras com diferentes concentrações de DNA extraído de larvas infectantes de *S. venezuelensis* utilizando *primers* específicos (desenhados) para a amplificação parcial do rDNA de *Strongyloides venezuelensis*.

Poços	Tamanho de banda
1. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
2. DNA larval (50ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
3. DNA larval (0,39ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
4. DNA larval (0,39ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
5. DNA larval (0,195ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
6. DNA larval (0,195ng/μl)	Aproximadamente 198 pb
7. Reagentes (sem DNA)	Sem amplificação

Tabela 5. Resultados do Protocolo I. PCR (primers desenhado e genérico), OPG e número de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado dos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis inoculados com 4000 L3. O Grupo 1 é composto por machos, identificados com números de 1 a 5. As fêmeas compõem o Grupo 2 e a elas foram atribuídos números de 6 a 10.

Grupo	Animal	Sexo	OPG*	Número de <i>S. venezuelensis</i> *	PCR (<i>primer</i> desenhado)*	PCR (<i>primer</i> genérico)*
1	1	M	85800	3815	~198 pb	~340 pb
1	2	M	14700	3159	~198 pb	~340 pb
1	3	M	45000	3744	~198 pb	~340 pb
1	4	M	9000	3506	~198 pb	~340 pb
1	5	M	15700	2157	~198 pb	~340 pb
	Média		34040	3276,2		
2	6	F	4900	2265	~198 pb	~340 pb
2	7	F	28100	2419	~198 pb	~340 pb
2	8	F	7800	2330	~198 pb	~340 pb
2	9	F	15900	2475	~198 pb	~340 pb
2	10	F	20800	2257	~198 pb	~340 pb
	Média		15500	2349,2		

*7 dias após a infecção

Tabela 6. Resultados do Protocolo I. PCR (primers desenhado e genérico), OPG e número de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado dos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis inoculados com 400 L3. O Grupo 3 é composto por machos, identificados com números de 11 a 15. As fêmeas compõem o Grupo 4 e a elas foram atribuídos números de 16 a 20.

Grupo	Animal	Sexo	OPG*	Número de <i>S. venezuelensis</i> *	PCR (<i>primer</i> desenhado) *	PCR (<i>primer</i> genérico) *
3	11	M	4200	297	~198 pb	~340 pb
3	12	M	9100	244	s/ amplific.	~340 pb
3	13	M	3100	260	~198 pb	~320, 340 pb
3	14	M	5300	268	~198 pb	~340 pb
3	15	M	3400	241	~198 pb	~340, 420 pb
	Média		5060	262		
4	16**	F	-	-	-	-
4	17	F	700	218	~198 pb	~320, 340, 420 pb
4	18	F	2300	131	~198 pb	~340, 420 pb
4	19	F	3400	251	~198 pb	~340, 420 pb
4	20	F	100	38	s/ amplific.	~340, 420 pb
	Média		1625	159,5		

*7 dias após a infecção

**Perda do animal 16 durante o experimento.

Tabela 7. Resultados do Protocolo I. PCR (primers desenhado e genérico), OPG e número de fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado dos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis inoculados com 40 L3. O Grupo 5 é composto por machos, identificados com números de 21 a 25. As fêmeas compõem o Grupo 6 e a elas foram atribuídos números de 26 a 30.

Grupo	Animal	Sexo	OPG*	Número de <i>S.</i> <i>venezuelensis</i> *	PCR (<i>primer</i> desenhado) *	PCR (<i>primer</i> genérico) *
5	21	M	100	7	s/ amplific.	~320, 340 , 380, 420 pb
5	22	M	0	1	s/ amplific.	~320, 380, 420 pb
5	23	M	0	17	s/ amplific.	~320, 340 , 380, 420 pb
5	24	M	100	9	s/ amplific.	~320, 340 , 420 pb
5	25	M	100	17	s/ amplific.	~320, 340 , 420 pb
	Média		60	10,2		
6	26	F	100	2	s/ amplific.	~320, 340 , 380, 420 pb
6	27	F	0	4	s/ amplific.	~320, 340 , 420 pb
6	28	F	0	5	s/ amplific.	~320, 340 , 420 pb
6	29	F	100	7	s/ amplific.	~320, 340 , 380, 420 pb
6	30	F	100	4	s/ amplific.	~320, 340 , 380, 420 pb
	Média		60	4,4		

*7 dias após a infecção

Tabela 8- Comparação entre as técnicas de OPG, PCR com o par de *primers* desenhado e PCR com o par de *primers* genérico (DORRIS et al., 2002) referentes aos animais do Protocolo I.

<i>Inóculo (L3)</i>	<i>Nº analisado</i>	<i>OPG*</i>		<i>PCR (primer desenhado)*</i>		<i>PCR (primer genérico)*</i>	
		Nº positivo	Sensibilidade (%)	Nº positivo	Sensibilidade (%)	Nº positivo	Sensibilidade (%)
4000	10	10	100	10	100	10	100
400	9	9	100	7	77,7	9	100
40	10	6	60†	0	0**†	9	90**

*7 dias após a infecção

** diferença estatística significativa (P<0,001)

† diferença estatística significativa (P<0,05)

Tabela 9. Resultados do Protocolo II - Fase Aguda. OPG, PCR (par de *primers* desenhado e par de *primers* genérico) e média do número de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado dos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis inoculados com 4000 L3. (As análises por PCR foram realizadas apenas nas amostras de dias pares, enquanto o número de fêmeas partenogenéticas só pode ser observado no 8º dia, correspondente ao sacrifício).

<i>Dia</i>	<i>OPG</i>	<i>PCR</i> (primer <i>desenhado</i>)	<i>PCR</i> (primer <i>genérico</i>)	<i>Número de S.</i> <i>venezuelensis</i>
0	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
1	0	-	-	-
2	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
3	0	-	-	-
4	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
5	0	-	-	-
6	8000	~ 198 pb	~ 340 , 380, 420 pb	-
7	22000	-	-	-
8	55400	~ 198 pb	~ 340 , 380, 420 pb	1732

Tabela 10. Resultados do Protocolo II - Fase de Eliminação da Infecção. OPG, PCR (par de *primers* desenhado e par de *primers* genérico) e média do número de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado dos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis inoculados com 4000 L3. (Só foram observadas fêmeas partenogenéticas no 32º dia, quando houve o sacrifício).

<i>Dia</i>	<i>OPG</i>	<i>PCR</i> (primer <i>desenhado</i>)	<i>PCR</i> (primer <i>genérico</i>)	<i>Número de S.</i> <i>venezuelensis</i>
0	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
1	0	-	-	-
2	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
3	0	-	-	-
4	0	Sem amplificação	~380, 420 pb	-
5	0	-	-	-
6	8400	~198 pb	~340 pb	-
7	26000	-	-	-
8	42300	~198 pb	~340 pb	-
9	16200	-	-	-
10	16800	~198 pb	~340 pb	-
11	21300	-	-	-
12	9300	~198 pb	~340 pb	-
13	5900	-	-	-
14	4200	~198 pb	~340 pb	-
15	2900	-	-	-
16	800	~198 pb	~340, 420 pb	-
17	500	-	-	-
18	1000	~198 pb	~340, 380, 420 pb	-
19	500	-	-	-
20	200	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
21	100	-	-	-
22	100	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
23	0	-	-	-
24	0	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
25	0	-	-	-
26	100	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
27	0	-	-	-
28	0	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
29	0	-	-	-
30	100	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	-
31	0	-	-	-
32	100	Sem amplificação	~340, 380, 420 pb	1,6

