



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA – ÁREA DE PARASITOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Strongyloides stercoralis*
(BAVAY, 1876) STILES & HASSALL, 1902 (RHABDITIDA,
STRONGYLOIDIDAE) ISOLADAS DE PACIENTES COM E
SEM SINTOMATOLOGIA DA REGIÃO DE ARARAQUARA – SP**

JÚLIO CÉSAR MINÉ



**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara para obtenção do título
de Doutor em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia – Área de Parasitologia.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Strongyloides stercoralis*
(BAVAY, 1876) STILES & HASSALL, 1902 (RHABDITIDA,
STRONGYLOIDIDAE) ISOLADAS DE PACIENTES COM E
SEM SINTOMATOLOGIA DA REGIÃO DE ARARAQUARA – SP**

JÚLIO CÉSAR MINÉ

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara para obtenção do título
de Doutor em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia – Área de Parasitologia.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA

Araraquara – São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Miné, Júlio César

M664c Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876)
Stiles & Hassall, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes
com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP / Júlio César Miné. –
Araraquara, 2009.
126 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: João Aristeu da Rosa

1. *Strongyloides stercoralis*. 2. Caracterização molecular.
3. Morfologia. 4. Epidemiologia. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas, no Laboratório de Parasitologia Clínica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) e no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos pertencentes à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, com apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por meio da concessão de bolsa de estudos de doutorado.

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais
José Carlos e Sônia que sempre me deram apoio e
incentivo incondicionais para que meus objetivos
fossem alcançados. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que auxiliaram de alguma forma para que esse meu trabalho fosse realizado. Muito trabalho, muitas conversas, muitas risadas, muitas lágrimas, enfim, muito APRENDIZADO durante esses quase quatro anos de doutoramento. De modo muito especial, deixo aqui meu agradecimento aos voluntários participantes deste trabalho de pesquisa, sem os quais nada seria possível.

Agradeço também...

- Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa que se dispôs a me orientar, mesmo não sendo, o meu projeto de doutorado, um trabalho vinculado às linhas de pesquisa de seu laboratório. Agradeço também a confiança que sempre depositou em mim, principalmente nas questões vinculadas ao meu preparo para a carreira acadêmica, que resultou em minha indicação para ser docente bolsista da disciplina de Parasitologia durante o 2º semestre de 2007. Muito bom trabalhar com um PROFESSOR com sua postura e que sempre mantém os olhos voltados à melhoria de vida e ao bem estar das pessoas... Obrigado!

- À Profa. Dra. Silmara Marques Allegrette, da Disciplina de Parasitologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, minha professora na graduação e pós-graduação e responsável por me apresentar à Parasitologia de uma forma apaixonante. Muito obrigado pela oportunidade de ter me convidado e incentivado a participar do Congresso em Paris e de conhecer locais que não pensava em conhecer. Agradeço de maneira muito especial pelas contribuições durante Exame Geral de Qualificação e por ter me alertado, durante sua participação no Exame Geral de Qualificação do Mestrado, que em Araraquara havia uma frequência considerável de *Strongyloides stercoralis* e que isso precisava ser estudado. Logo comecei a pensar na possibilidade de realizar um projeto com esse parasito e, aqui está o produto desse

trabalho, que ainda merece algumas lapidadas, mas deixa uma importante contribuição para que novos estudos sejam feitos. Obrigado por tudo!!!

- À Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, da Disciplina de Imunologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, que de maneira muito gentil permitiu que eu utilizasse seu laboratório para que as técnicas de biologia molecular fossem feitas. Tenho convicção de que parcerias na pesquisa científica são de extrema importância e o dia-a-dia em seu laboratório me fez perder a refratariedade que eu tinha da biologia molecular.

- À Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, da Disciplina de Parasitologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, com quem tive o primeiro contato numa disciplina da pós-graduação que fiz na UNICAMP e que, por conta de meu trabalho com *Strongyloides stercoralis*, tornou-se uma referência que sempre me atendeu de forma muito gentil. Agradeço a valiosa contribuição durante o Exame Geral de Qualificação e o incentivo a mim dado durante nossas conversas.

- À Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, uma amiga pra vida toda! Quem dera ter um centésimo de sua paciência! Muito obrigado por sempre se preocupar comigo, por sempre parar de fazer suas coisas pra escutar minhas lamúrias, pela sua disposição em me ajudar nos manuscritos em inglês e por sempre me incentivar, mostrando caminhos possíveis a serem seguidos.

- À amiga Dra. Daniela Luz Ambrósio, a Dani Light, pelas suas valiosíssimas contribuições e esclarecimento de dúvidas. Obrigado pelo incentivo, pela companhia nos almoços, pelas risadas e por escutar meus desabafos científicos e pessoais!

- Ao amigo Dr. Marco Túlio Alves da Silva, que sempre se dispôs a me auxiliar e por esclarecer minhas dúvidas (que eram muitas!) com as técnicas de biologia molecular. Muito obrigado pela paciência e pelo convívio desde a época em que morávamos na mesma república.

- À amiga Dra. Isabel Martinez, a Bel, por sempre estar pronta a me ajudar, tanto na bancada, quanto em discussões sobre parasitologia e também quando preciso ir para o pronto-socorro!!! Você foi meu braço direito quando fui ao Congresso no exterior e cuidou muito bem das minhas "larvinhas". Obrigado pela amizade, pelo incentivo de sempre e por ser, também, responsável pela minha paixão pela Parasitologia!

- À Profa. Dra. Márcia da Silva, da disciplina de Química Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, minha professora, madrinha de formatura e amiga de todas as horas, que escuta todas as minhas insatisfações e que também vibra comigo nas alegrias! Grande profissional, exemplo de PROFESSORA. Obrigado pelo incentivo, pela parceria e por me ajudar nos momentos que precisei.

- À Profa. Dra. Márcia Ap. Silva Graminha, da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, pela amizade, incentivo e confiança em meu trabalho como docente bolsista da disciplina de Parasitologia Clínica (que eu amo!) durante o ano de

2008 e o 1º semestre de 2009. Jamais me esquecerei dessa experiência. Agradeço também pelo auxílio quando comecei a escrever meu projeto. Valeu!!!

- À MSc. Joyce Aparecida Martins pelo auxílio para que fosse possível realizar o sequenciamento das minhas amostras de *Strongyloides stercoralis*. "... é por isso que a pesquisa no Brasil vai pra frente!!!"... Muito obrigado!!!

- Às amigas do Laboratório de Parasitologia Clínica do Núcleo de Apoio à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara: Farmacêutica Márcia Lúcia Pirasol Vanunci, MSc. Leila Regina Lima Rossi, Raphaela Gulla e Maria Amélia Silva Conçolaro pela ajuda durante a realização dos exames coproparasitológicos e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

- Ao Professor Dr. Vanderlei Rodrigues e à Elenice Aparecida Macedo da Faculdade de Medicina da USP - RP, por me atenderem tão gentilmente, quando precisei de ajuda com o sequenciamento de minhas amostras na etapa final do doutorado. Valeu!

- À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, da disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, que sempre me recebeu com sua contagiante alegria, por ter me auxiliado na redação das metodologias dos ensaios biológicos que eu imaginava fazer nesse projeto. A infecção experimental não foi possível ainda, mas espero que num breve futuro, possamos realizar trabalhos juntos e ver quais serão as respostas dos macrófagos frente aos parasitos de diferentes cepas. Obrigado pelo incentivo de sempre!

- À minha querida amiga Maria Zenaide Tita Fernandes, funcionária aposentada da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, obrigado por também ser responsável por fazer da Parasitologia minha paixão. Agradeço sua atenção comigo, seu carinho e seus ensinamentos.

- À Profa. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga, professora aposentada da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, minha professora de Parasitologia Clínica que desde a época de graduação me incentivou a seguir na carreira acadêmica. Obrigado pelo carinho de sempre, por me incentivar nos momentos em que tive dúvida e pela amizade.

- À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, da disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, por ter disponibilizado uma alíquota de iniciadores randômicos para que fosse possível averiguar se a técnica de RAPD poderia ser utilizada nesse trabalho.

- À Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, por ter disponibilizado uma alíquota do antibiótico tetraciclina para que eu pudesse testar sua eficácia na axenização das culturas de *Strongyloides stercoralis*.

- Às amigas da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornellas Silva, pelo carinho e paciência que sempre me dispensam.

- Ao Prof. Dr. Pedro Luis Silva Pinto, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, por disponibilizar carvão ativado floculado para que eu pudesse dar início ao meu trabalho.

- À amiga Dra. Elenice Messias do Nascimento Gonçalves e aos funcionários do Laboratório de Parasitologia da DLC - HCFMUSP - SP, de quem sempre me recordo, pois fazem parte da minha formação, jamais me esquecerei dos dias em que estive com vocês! Mesmo a distancia sei que sempre torceram por mim!

- À Margarete Rossi Ferreira, secretária do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, que com seu alto astral trouxe alegria ao Departamento! Obrigado por sempre me atender nos momentos que precisei (principalmente quando precisei da impressora "INOXI"), sempre de maneira muito gentil!

- Aos meus amigos de pós-graduação: Aline Rimoldi, Cláudia Solano Rocha, Júlio César Rente Ferreira Filho, Renata Tomé Alves, Sueli Gardim, Vagner José Mendonça, aos que já foram embora do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, Hernany Henrique Garcia Justino e Marinaide Pereira Naegele, à Bel que não foi embora, mas já terminou sua tese e também aos estagiários de Iniciação Científica Leandro Augusto Rosseto e Karina Pereira Barbieri, tenho certeza que juntos formamos uma equipe bastante competente... Obrigado pela convivência do dia-a-dia.

- Às amigas: MSc. Cláudia Solano Rocha, a Claudinha, que de modo muito especial, me auxiliou nas análises das sequências de DNA obtidas, bem como nas análises estatísticas e à Sueli Gardim que juntamente com a Claudinha, dispôs de seu tempo livre enquanto eu estava ausente (num Congresso em Teresópolis - RJ) e deu continuidade aos trabalhos de purificação de DNA do *Strongyloides stercoralis*. Valeu!!!

- Aos meus irmãos Neto e Tânia e à minha cunhada Adriana, que sempre torceram por mim e me dão uma prazerosa convivência nos momentos em que conseguimos estar próximos. Amo vocês!!!

- Aos meus queridos amigos Nicholas André Cleto Costa, Ana Cláudia Noboli, Stella de Medeiros Ivahy Badaró, Gustavo Silva Tavares, Letícia Marquês Anselmo, Alexandra Hissae Rocha Shoshima, Vânia Hercília Talarico, Lucília Brochado Lepschi, Daniela Degan Pereira, Luis Octávio Regasini, Émerson Tosco, João Marcos Batista Júnior, Juliana Aparecida Severi, Helen Mariana Baldan, Grimaud Valladão Júnior e Wilton Natal Milani que de perto ou de longe sempre me incentivaram e torceram muito por mim.

- Aos meus professores, desde a época do pré-primário até os da pós-graduação, que, por conta de seus ensinamentos fizeram despertar em mim a vontade de seguir seus passos. De maneira especial lembro aqui da Tia Maristela (pré-primário), Dona Neuza Queluz, que me ensinou a escrever, Dona Cida Galli (a matemática com ela era bem mais fácil), Dona Laura Padilha Pereira (exímia professora de Língua Portuguesa), meus professores de literatura, química e de biologia da época do cursinho: Rossana, Ana Cláudia, Ana Maria, Mário Marcos, Momaya e Adalberto, e dos professores da faculdade e da pós-graduação que me deram sólida formação: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento (Botânica), Profa. Dra. Maria Célia

Bertolini (Bioquímica), Profa. Dra. Edwil Ap. de Lucca Gattás (minha primeira orientadora na faculdade), Profa. Dra. Aureluce Demonte (Bromatologia), Prof. Dr. João Aristeu da Rosa (Parasitologia), Profa. Dra. Silmara Marques Allegrette (Parasitologia), Prof. Dr. Francisco Miguel Belda Neto (Parasitologia), Profa. Dra. Márcia da Silva (Química Farmacêutica), Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros (Imunologia), Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite (Microbiologia), Profa. Dra. Ana Dóris de Castro (Farmacotécnica), Profa. Dra. Maria do Carmo Longo - "Cacá" (Farmacologia), Profa. MSc. Rita Ap. David (Coordenadora do Programa Universidade Solidária, equipe 2001), Profa. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga (Parasitologia Clínica), Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto (Microbiologia Clínica), Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos (Imunologia Clínica), Profa. Dra. Christiane Pienna Soares (Citologia Clínica), Profa. Dra. Maria Teresa Pepato (Bioquímica Clínica), Prof. Dr. Luis Marcos da Fonseca (Hematologia Clínica) e Prof. Dr. José Salvador Lepera (Toxicologia)... O compromisso de vocês pela ótima formação de seus alunos é o exemplo que procuro seguir em minha vida profissional! De maneira alguma posso me esquecer de citar os tão importantes funcionários das disciplinas de graduação Maria Zenaide Tita Fernandes (Parasitologia), Dra. Isabel Martinez (Parasitologia Clínica), Ivone S. Anno (Microbiologia), Maximino Antonio Boschi (Citologia e Hematologia Clínica), Dra. Elaine Toscano Miranda (Micologia Clínica), Sandra Maria S. da Vinha De Lorenzo (Toxicologia) e Valéria Cristina de Oliveira Alves (Bioquímica Clínica) a postura ética e o compromisso de vocês com o aprendizado são pra mim exemplos a serem seguidos! Muito obrigado! Agradeço também a Professora, que apesar de nunca ter me dado aulas, desde criança sempre admirei, assistindo parte de suas aulas quando a esperava para irmos juntos pra casa... MINHA MÃE!

- À AlphaCarbo Industrial Ltda., por disponibilizar o carvão ativado floculado para que fosse possível realizar as culturas dos parasitos.

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de estudos concedida.

- À Deus pela paz na condução desse trabalho e por sempre estar ao meu lado.

“...Depois da estrada começa

Uma grande avenida

E no fim da avenida

Existe uma chance, uma sorte

Uma nova saída...”

(Rita Lee, Coisas da Vida)

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
I – INTRODUÇÃO	24
I. 1. Considerações Gerais	24
I. 2. <i>Strongyloides stercoralis</i> e Estrongiloidíase	26
I. 3. Aspectos moleculares	42
I. 4. Justificativa	45
II – OBJETIVOS	47
III – MATERIAL E MÉTODOS	48
III. 1. Fluxograma de trabalho	48
III. 2. Estudos Epidemiológicos (Exames Laboratoriais, Coleta dos dados dos voluntários da Pesquisa e Avaliação da Sazonalidade do Aparecimento de <i>Strongyloides stercoralis</i>)	49
III. 3. Descrição das Metodologias utilizadas para a realização dos Exames de Fezes e para a coprocultura	50
III. 3. 1. Exame direto a fresco	51
III. 3. 2. COPROTEST [®]	51
III. 3. 3. Técnica de RUGAI, MATTOS E BRISOLA	52
III. 3. 4. Coprocultura em Carvão Vegetal Ativado (Método de Loss Modificado)	53
III. 4. Estudo Morfológico e Morfométrico das Larvas Rabditóides e Filarióides de <i>Strongyloides stercoralis</i>	54
III. 5. Estudo Morfológico por Microscopia Eletrônica de Varredura	56
III. 6. Caracterização Molecular (NESTED PCR e Sequenciamento do ITS-1 do rDNA)	57
III. 7. Análises Estatísticas	60
IV – RESULTADOS	61
V – DISCUSSÃO	82
VI – CONCLUSÕES	98
VI – REFERÊNCIAS	101
ANEXO	125

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 01 – Resultado dos exames coproparasitológicos realizados em Araraquara entre 2005 e 2009.	63
Tabela 02 – Espécies de enteroparasitas encontrados em 19905 amostras fecais de pessoas residentes em oito municípios da região de Araraquara entre 2005 e 2009.	64
Tabela 03 – Distribuição das faixas etárias segundo o sexo dos indivíduos portadores de <i>S. stercoralis</i> . Araraquara, 2005 – 2009.	66
Tabela 04 – Procedência dos indivíduos portadores de <i>S. stercoralis</i> . Araraquara, 2005 – 2009.	67
Tabela 05 – Distribuição dos indivíduos portadores de enteroparasitas em relação à presença ou ausência de sintomas. Araraquara, 2005 – 2009.	68
Tabela 06 – Frequência de exames positivos para <i>S. stercoralis</i> em cada mês durante os anos de 2005 a 2008.	71
Tabela 07 – Média e Desvio Padrão das medidas (em μm) das larvas rabditóides e filarióides de <i>S. stercoralis</i> obtidas de pacientes da região de Araraquara.	73

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 01 – Distribuição geográfica das helmintíases intestinais nos diferentes continentes. Adaptado de http://www.medicine.mcgill.ca/tropmed/imagesplaty/mapworm.jpg	25
Figura 02 – Distribuição geográfica da estrogiloidíase humana nos diferentes continentes. Adaptado de: http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Tropen/Strongyloidiasis .	29
Figura 03 – Esquema da organização do DNA ribossomal típico de eucarioto (COLEMAN, 2003).	43
Figura 04 – Fotomicrografias das larvas rabditóides (1 – Comprimento Total; 2 – Comprimento do Esôfago; 3 – Comprimento do Vestíbulo Bucal; 4 – Largura; 5 – Comprimento do Primórdio Genital; 6 – Área do Primórdio Genital; 7 – Distância do Primórdio Genital à Cauda; 8 – Comprimento da Cauda). Aumento de 400X.	55
Figura 05 – Fotomicrografias das larvas filarióides (A – Comprimento do Esôfago e Largura (seta); B – Comprimento da Cauda – Aumento de 400X; C – Comprimento Total – Aumento de 200X).	56
Figura 06 – Limites dos municípios da Região Administrativa Central do Estado de São Paulo. Em destaque, os municípios de onde os voluntários da pesquisa são oriundos (adaptado de www.cidadespaulistas.com.br)	61
Figura 07 – Procedência das amostras enviadas para exame. Araraquara, 2005 – 2009.	62
Figura 08 – Distribuição dos resultados positivos dos exames coproparasitológicos das gestantes (n=1165) Araraquara, 2005 – 2009.	62

- Figura 09** – Distribuição dos resultados positivos dos exames coproparasitológicos (n = 3749). Araraquara, 2005 – 2009. **63**
- Figura 10** – Distribuição dos resultados positivos dos exames coproparasitológicos (n = 3749). Araraquara, 2005 – 2009. **65**
- Figura 11** – Consistência das fezes examinadas (n=19905). Araraquara, 2005 – 2009. **65**
- Figura 12 A** – Distribuição da sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis* em relação aos dias com chuvas nos bimestres do período de Janeiro de 2005 e Janeiro de 2009. **69**
- Figura 12 B** – Distribuição da sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis* entre os meses de Janeiro de 2005 e Janeiro de 2009 em relação aos dias com chuva nesses meses. **70**
- Figura 13** – Dispersão dos parâmetros morfométricos (1 – CTr X CEr; 2 – CTr X DPC; 3 – CEr X DPC; 4 – CTf X CEF). **74**
- Figura 14** – Fotomicrografias de larvas filarióides de *S. stercoralis*. A – visão total (aumento de 200X); B – fenda no corpo da larva – seta branca (aumento de 1500 x); C – detalhes da fenda – seta branca – e estrias transversais – seta preta (aumento de 3000X). **75**
- Figura 15** – Gel de agarose a 1% com produto de extração de DNA genômico corado com brometo de etídeo de 24 isolados de larvas filarióides de *S. stercoralis*. **76**
- Figura 16** – Gel de agarose a 1,5% com produto de Amplificação do ITS-1 do rDNA corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 28 – isolados de larvas filarióides de *S. stercoralis*, com aproximadamente 680 pb. **77**

Figura 17 – Alinhamento de 13 sequências de larvas filarióides de *S. stercoralis* isoladas de pacientes sintomáticos provenientes de Américo Brasiliense e Araraquara.

79

Figura 18 – Alinhamento de 30 sequências de larvas filarióides de *S. stercoralis* isoladas de pacientes assintomáticos provenientes de Américo Brasiliense, Araraquara, Gavião Peixoto e Rincão.

80

ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ethylene Diamine Tetracetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ETS: espaçador externo transcrito

g: força da gravidade

DNAG: DNA genômico

H₂O: água

ITS: espaçador interno transcrito

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

M: molar

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mL: mililitro

mM: milimolar

µL: microlitro

µM: micromolar

NaCl: Cloreto de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

pb: pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PM: Marcador de peso molecular

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

Tris-HCl: Tris-Ácido clorídrico

TA: Temperatura ambiente

TAF: líquido conservador de larvas (2mL trietanolamina, 7mL formol 40% e água destilada q.s.p. 100mL)

U: unidade

UV: luz ultravioleta

RESUMO

Caracterização de cepas de *Strongyloides Stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassall, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara – SP

A estrogiloidíase é uma doença parasitária que tem distribuição mundial heterogênea, cuja prevalência é dividida em três categorias: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). Na região de Araraquara, estudos de frequência de enteroparasitoses vêm sendo conduzidos desde 1970 e mostram que a estrogiloidíase é endêmica na região. Com o intuito de realizar caracterização morfométrica de diferentes isolados humanos desse helminto, provenientes dos municípios de Araraquara, Américo Brasiliense, Gavião Peixoto, Motuca e Rincão foi feita a mensuração de larvas rabditóides e filarióides e sequenciamento da região ITS-1 do rDNA das larvas filarióides. Com o auxílio do programa de captura e mensuração de imagens Motic Images Advanced 3.2., os parâmetros das larvas rabditóides e filarióides propostos por TEIXEIRA, 1996, foram mensurados após fixação das mesmas em TAF. A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo descrito por NILFOROUSHAN et al., 2007 e em seguida realizou-se a amplificação do ITS-1 por meio de NESTED-PCR. Os fragmentos de aproximadamente 680 pb obtidos foram purificados, sequenciados e a comparação de sequências foi realizada pelo programa ClustalW. Apenas com os resultados da análise morfométrica, não foi possível caracterizar diferentes cepas de *S. stercoralis*, uma vez que os valores dos parâmetros mensurados foram bastante

homogêneos em larvas de pacientes com e sem sintomas e também daqueles provenientes de municípios distintos. Porém, por meio do sequenciamento da região ITS-1 do rDNA de larvas filarióides de *S. stercoralis* de 43 isolados provenientes de Américo Brasiliense, Araraquara, Gavião Peixoto e Rincão foi possível caracterizar cepas distintas desse nematódeo de diferentes procedências, uma vez que essas sequências, quando comparadas dentro do mesmo grupo (Araraquara versus Araraquara), mostraram alto grau de conservação; entretanto, quando comparadas separadamente (Araraquara versus Américo Brasiliense), mostraram-se altamente polimórficas. Tal observação permite sugerir que a região ITS-1 do rDNA possa ser utilizada como marcador para a caracterização de diferentes cepas de *S. stercoralis*, já que se mostrou suficientemente polimórfica e corrobora dados da literatura que afirmam que apenas os caracteres morfométricos não são suficientes para detecção de diferentes cepas desse parasito.

ABSTRACT

Characterization of *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassall, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) strains isolated from patients with and without symptoms in the region Araraquara – SP.

Strongyloidiasis is a parasitic disease that occurs worldwide heterogeneous, whose prevalence is divided into three categories: sporadic (<1%), endemic (1-5%) and hyperendemic (> 5%). In the region of Araraquara, studies the frequency of intestinal parasites have been conducted since 1970 and show that strongyloidiasis is endemic in the region. In order to perform morphometric characterization of different isolates of human intestinal worms, from the municipalities of Araraquara, Américo Brasiliense, Gavião Peixoto, Motuca and Rincão the measurement was made of rhabditiforms and filariforms larvae and sequencing of the ITS-1 rDNA filariform larvae. With the help of the program capture and measurement of images Motic Images Advanced 3.2., the rhabditiforms and filariforms larvae parameters proposed by TEIXEIRA, 1997, were measured after fixed on the TAF. The extraction of genomic DNA was performed according to protocol described by NILFOROUSHAN et al., 2007 and then held the amplification of ITS-1 by nested-PCR. Fragments of about 680 bp obtained were purified, sequenced and the sequence comparison was performed by the program ClustalW. Only the results of the morphometric analysis was not possible to characterize different *S. stercoralis* strains, since the values of the parameters measured were quite homogeneous in larvae of patients with and without symptoms and also those

from different municipalities. However, through the sequencing of the ITS-1 rDNA from 43 isolates *S. stercoralis* filariform larvae from Américo Brasiliense, Araraquara, Gavião Peixoto and Rincão was possible to characterize different strains of nematode from different sources, since these sequences, when compared within the same group (Araraquara versus Araraquara), showed a high degree of conservation, however, when compared separately (Araraquara versus Américo Brasiliense), were highly polymorphic. This observation allows suggesting that the ITS-1 rDNA could be used as a marker for the characterization of different *S. stercoralis* strains, as proved sufficiently polymorphic and corroborates the literature which claims that only the morphometric characters are not sufficient to detect different strains of this parasite.

I – INTRODUÇÃO

I. 1 – Considerações Gerais:

Durante a história relativamente curta na Terra, os seres humanos entraram em contato com um número muito grande de parasitos, cerca de 300 espécies de helmintos e mais de 70 espécies de protozoários (ASHFORD, 1998). Muitas dessas espécies de parasitos acometem o homem raramente e outras de forma acidental, porém, cerca de 90 delas são relativamente comuns e são responsáveis por causar algumas das doenças parasitárias mais importantes e que levam grande número de pessoas a óbito anualmente, e por conta disso, recebem maior atenção (COX, 2002).

As parasitoses intestinais representam a doença mais comum do globo terrestre. São endêmicas em países em desenvolvimento, onde se constituem problemas de Saúde Pública (MONTEIRO et al., 1986; WHO, 1987; MONTEIRO, 1995). Ultimamente as relações entre os parasitos e seus hospedeiros estão se modificando sobremaneira por conta da AIDS. A maioria das doenças parasitárias ocorre em países tropicais, que por sua vez possuem graves problemas econômicos e sociais, onde a infecção pelo vírus HIV grassa (COX, 2002).

Os helmintos parasitas do homem compreendem espécies pertencentes a dois Filos: Platyhelminthes ou vermes achatados dorsoventralmente e Nematoda que apresentam corpo cilíndrico (COSTA, 2005). Os nematódeos são provavelmente os mais importantes causadores de

doenças parasitárias nos animais domésticos e são responsáveis por debilitar um grande número de pessoas no mundo (LEVINE, 1980).

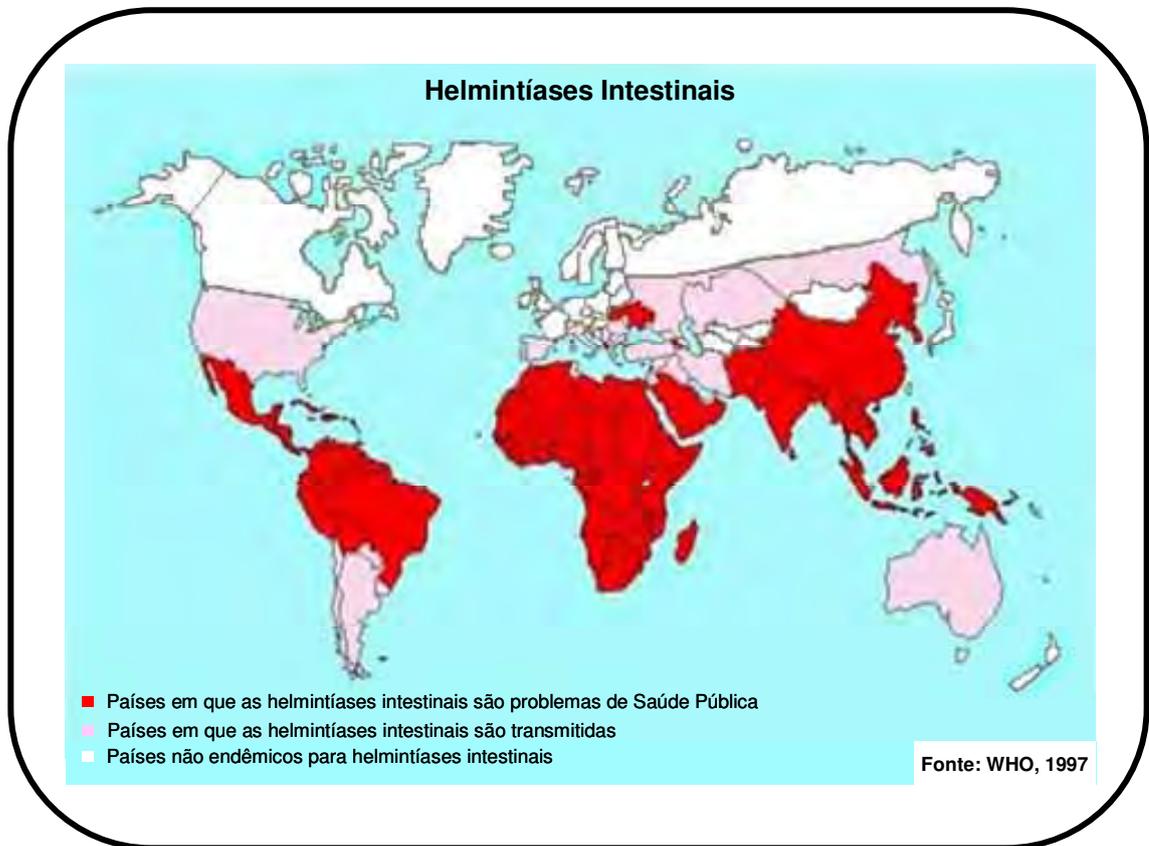


Figura 01 – Distribuição geográfica das helmintíases intestinais nos diferentes continentes.

Adaptado de [http:// www.medicine.mcgill.ca/tropmed/imagesplaty/mapworm.jpg](http://www.medicine.mcgill.ca/tropmed/imagesplaty/mapworm.jpg)

É estimado que um quinto da população mundial esteja parasitada por nematódeos e a maior concentração das pessoas infectadas encontra-se nos países em desenvolvimento (COSTA, 2005), como se pode notar na Figura 01. Aproximadamente 300 milhões de pessoas estão parasitadas por algum helminto no mundo e cerca de 150 mil morrem anualmente vítimas das complicações ocasionadas pelas helmintíases. As helmintíases causadas pelos vermes de transmissão pelo solo e a esquistossomose são as doenças

parasitárias mais prevalentes que afetam a população que vive em áreas pobres dos países em desenvolvimento (JAMISON, 2006).

Estima-se que, no mundo, cerca de 152 milhões de pessoas estejam infectadas por Ancilostomídeos, 60 milhões albergam *Ascaris lumbricoides*, 45 milhões *Trichuris trichiura* e 30 milhões por *Strongyloides stercoralis* (MACHADO et al., 2003).

I. 2 – *Strongyloides stercoralis* e Estrogiloidíase:

Strongyloides stercoralis foi referido em 1876 por Louis Alexis Normand, pela primeira vez em fezes diarréicas de soldados franceses que vinham da Cochinchina (atual Vietnã). Os vermes foram então descritos pelo Professor Arthur René Jean Baptiste Bavay, que lhes deu o nome de *Anguillula intestinalis*, por isso a denominação de anguilulose para a doença ocasionada por tal helminto. O gênero *Strongyloides* foi definido em 1879 por Grassi, após a descoberta de Normand. A demonstração de que no ciclo de vida desse parasito ocorre uma fase estercoral constituída por vermes de vida livre e outra fase intestinal representada pela fêmea parasita originou a denominação *Strongyloides stercoralis*, (Bavay, 1876) Stiles e Hassall, 1902. (“*Strongylus*” = arredondado; “*oides*” = semelhantes; “*stercus*” = esterco) (CAMPOS; FERREIRA, 2005).

Ribeiro da Luz reportou pela primeira vez em 1880, no Estado do Rio de Janeiro, a importância do *S. stercoralis* como agente etiológico da estrogiloidíase no Brasil e, posteriormente, em 1948, MORAES enfatiza a importância médico-sanitária dessa parasitose (MAIA et al., 2006; RODRIGUES, 2008).

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae que é composta por parasitas de interesse médico e veterinário (NCBI, 2009).

Admite-se atualmente 52 espécies do gênero *Strongyloides* que podem ocorrer em aves, répteis, anfíbios, mamíferos domésticos e silvestres e no homem causando a estrogiloidíase (GROVE, 1996). SPEARE em 1989 relata que seis espécies de do gênero *Strongyloides* podem causar infecções intestinais no homem, a saber: *S. stercoralis*, *S. fuelleborni fuelleborni*, *S. fuelleborni kellyi*, *S. procyonis*, *S. ransomi* e uma espécie não identificada isolada de ratos selvagens em New Orleans, Louisiana, EUA. Contudo, o que se observa na literatura é que apenas três dessas espécies acometem o homem: *S. stercoralis* (Bavay, 1876) e *S. fuelleborni* (von Linstow, 1905) (LEVINE, 1980). *S. fuelleborni*, parasita natural de macacos do velho Mundo, provoca a estrogiloidíase humana em algumas regiões da África e Ásia. A subespécie *S. fuelleborni kellyi*, que foi descrita recentemente parasitando habitantes de Papua-Nova Guiné (ASHFORD; BARNISH; VINEY, 1992), é hoje considerada espécie distinta, devido aos estudos de filogenia molecular realizados, que sugerem que *S. fuelleborni kellyi* não seria uma subespécie (DORRIS et al., 2002).

Outras espécies do gênero *Strongyloides* como *S. ransomi* e *S. procyonis* já foram relatadas como sendo capazes de causar infecção no homem, porém esses relatos tratam de infecções experimentais (FREEDMAN, 1991). SCHWARTZ e TARLOW em 2009 relatam que as espécies *S. procyonis* e *S. myopotami* são responsáveis por infecções zoonóticas que não se mantêm.

As características morfológicas distintas entre as diferentes formas de *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* foram descritas por SPEARE, 1989 e os aspectos morfobiológicos de *S. fuelleborni* foram posteriormente sintetizados por GROVE, 1996. Embora ambas as espécies desenvolvam ciclos evolutivos direto e indireto, a eclosão dos ovos de *S. fuelleborni* ocorre no solo, havendo controvérsia em relação a auto-infecção humana nessa espécie (EVANS et al., 1991).

As espécies *S. fuelleborni* e *S. cebus* são parasitas de primatas inferiores e *S. myopotami*, *S. rattii* e *S. venezuelensis* são parasitas de roedores, essas duas últimas têm sido bastante utilizadas em pesquisas que envolvem os mecanismos imunológicos da estrogiloidíase (CAMPOS; FERREIRA, 2005).

A estrogiloidíase humana, estrogiloidose ou anguilulose é a doença parasitária causada por vermes do gênero *Strongyloides* que tem distribuição mundial heterogênea, sendo a prevalência da infecção humana pelo *S. stercoralis* dividida em três categorias: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES; DREYER, 1993). Todas as áreas agrupadas como hiperendêmicas (Figura 02) estão situadas nos trópicos, onde as condições climáticas favorecem a disseminação desse parasito. Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto que nos trópicos a doença acomete principalmente as crianças pela frequente permanência em solos contaminados (GROVE, 1996).

As larvas de *S. stercoralis* apresentam tropismos que podem ter correlações epidemiológicas na doença parasitária que causam: geotropismo negativo: movimento de ascensão das larvas pelas superfícies; histotropismo positivo: penetração das larvas infectantes pela pele; tigmotropismo positivo:

tendência a se fixarem em substratos; termotropismo positivo: deslocamento para onde a temperatura for maior; hidrotropismo positivo: tendência de deslocamento para onde tiver água; quimiotropismo ao O₂ positivo; quimiotropismo ao CO₂ negativo; galvanotropismo indiferente e fototropismo indiferente (MORAES, 1948).

São consideradas áreas endêmicas para estrogiloidose a América do Sul, sudeste da Ásia, África subsaariana e a região dos Montes Apalaches nos EUA. Já em países da Europa como Inglaterra, França, Suíça, Itália, Iugoslávia, Polônia, Hungria, Romênia, Bélgica e Espanha são relatados esporadicamente casos dessa doença (ROMAN SANCHÉS et al., 2001)

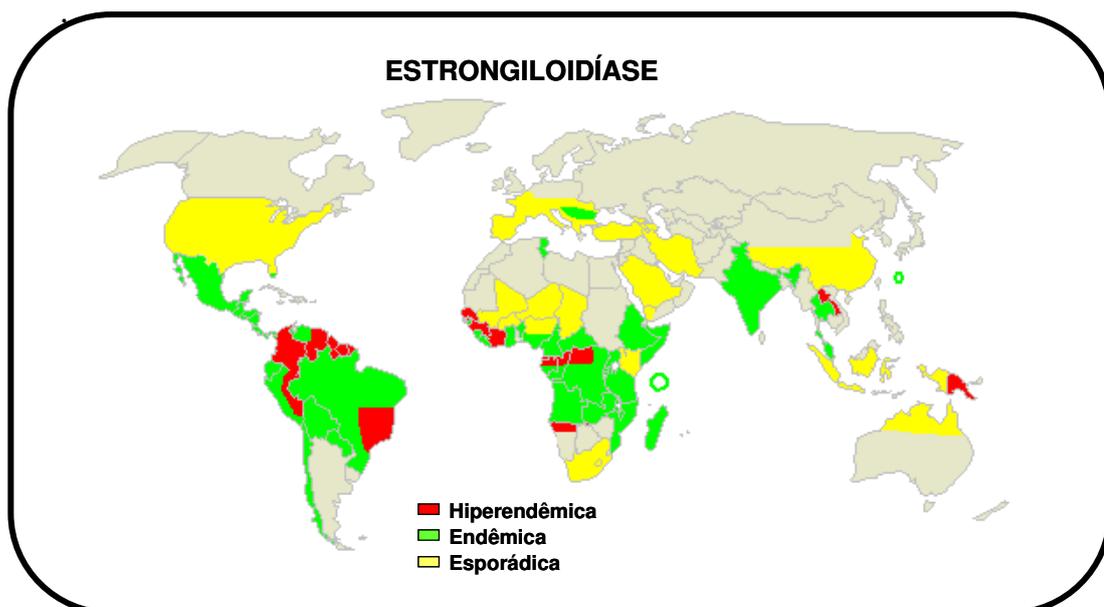


Figura 02 – Distribuição geográfica da estrogiloidíase humana nos diferentes continentes.

Adaptado de: <http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Tropen/Strongyloidiasis>.

No Brasil, a estrogiloidíase é uma doença de grande importância em saúde pública com taxas de infecção atingindo até 41,5% (DE PAULA et al., 2000), de acordo com as diferentes regiões e métodos de escolha para o diagnóstico parasitológico.

Em Pelotas – RS, dos 1661 exames de fezes realizados 39,8% foram positivos para a presença de algum parasito intestinal e *S. stercoralis* foi observado em 0,6% das amostras. Num estudo realizado na cidade de Itajaí – SC observou-se que 10,0% dos pacientes HIV positivos estavam com estrogiloidíase enquanto que essa parasitose foi observada em 5,6% dos pacientes HIV negativos (VILLIELA et al., 2002).

Em Maceió – AL, KOBAYASHI et al., 1996, observaram uma prevalência de *S. stercoralis* de 6,0% entre crianças menores de 16 anos. Em Goiânia – GO no período de 1978 a 1985 foram examinadas amostras de fezes de 1878 pessoas, das quais 79 (6,1%) apresentaram o referido nematóide (SANTOS et al., 1990).

Na região Sudeste, a prevalência da estrogiloidíase em crianças, varia de 0,39% (ALMEIDA; COSTA-CRUZ, 1988) a 13,0% (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998).

Avaliando os índices de estrogiloidíase humana em fezes de crianças imunodeprimidas e imunocompetentes da cidade de Uberlândia – MG, PAULA et al., 2000, observaram a frequência de 2,41% dentre as imunodeprimidas e 4,41% dentre as imunocompetentes, porém ao analisarem os resultados do teste imunoenzimático observaram que dentre as crianças imunodeprimidas 12,05% eram soropositivas para infecção pelo *S. stercoralis*.

No Estado de São Paulo, vários estudos abordando a frequência de parasitoses intestinais em diferentes municípios foram realizados e a frequência de *S. stercoralis* observada foi a seguinte: 6,75% em Botucatu (SALATA et al., 1972); 14,95% em Américo Brasiliense (BELDA NETO et al., 1976); 6,0% em Ribeirão Preto (MARZOCHI; CAVALHEIRO, 1978); 0,8% em São

Carlos (PEDRAZZANNI et al., 1988); 0,4% em Guarulhos (CHIEFFI et al., 1988); 10,8% em Campinas (ROSSI et al., 1993); 1,9% em Assis (LUDWIG et al., 1999) e 5,56% em Holambra (KOBAYASHI et al., 1996).

No município de Araraquara inúmeros estudos de frequência de parasitoses intestinais vêm sendo conduzidos desde a década de 1970 e mostram que a estrogiloidíase é bastante frequente no município: 28,37% dentre internos de um educandário no ano de 1970 (BUAINAIN; GIAZZI, 1970); 13,22% dentre os moradores da Vila Vieira em 1974 (GIAZZI et al., 1974); 1,3% dentre os calouros da Faculdade de Farmácia e Odontologia no ano de 1976 e no mesmo ano, 6,2% na população com baixo nível sócio-econômico (GIAZZI et al., 1976; MARTINI et al., 1976); 6,7% em crianças de 1 a 14 anos do bairro Jardim América (GIAZZI et al., 1982); 2,6% dentre as merendeiras de escolas públicas estaduais do município em 1984 (MENDONÇA et al., 1984); 1,8% dentre as pessoas que procuraram o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP entre os anos de 1999 e 2003 (MINÉ et al., 2004) e 6,7% dentre os moradores de Araraquara e região entre os anos de 2004 e 2005, sendo o *S. stercoralis*, o helminto mais frequente nas fezes examinadas (MINÉ; ROSA, 2008).

Muito se discutiu acerca dos conhecimentos sobre o ciclo evolutivo do *S. stercoralis*: SANDGROUND, em 1925, considerava que as fêmeas parasitas eram hermafroditas; KREIS em 1932 e FAUST em 1933 propuseram a presença de vermes machos no ciclo parasitário (proposição totalmente refutada uma vez que a morfologia dos exemplares descritos por esses autores era idêntica a dos exemplares da geração de vida livre); em 1936, GRAHAM observou em infecção experimental, que os machos eram desnecessários e que

as fêmeas parasitas produzem ovos viáveis. Hoje, portanto, é sabido que a fêmea parasita produz ovos por partenogênese.

S. stercoralis é o principal agente etiológico da estrogiloidíase humana, uma vez que dentre as espécies que parasitam o homem, esta é a mais frequente. É uma espécie dimorfobiótica, isto é, apresenta uma forma parasitária e outra de vida-livre, distintas entre si, que se intercalam no ciclo evolutivo. O ciclo de vida de *S. stercoralis* é considerado complexo, uma vez que se pode desenvolver no meio ambiente (ciclo de vida livre ou indireto) ou no hospedeiro humano (ciclo parasitário ou direto) (PAULA, 2004).

No ciclo de vida livre, as larvas rabditóides eliminadas no meio externo junto com as fezes, em ambiente propício, isto é, úmido e quente (25 a 32°C), podem sofrer muda e evoluírem dentro de 24 a 48 horas em larvas filarióides infectantes, capazes de penetrar em outro indivíduo e iniciar novo ciclo parasitário sem a interposição do estágio de adulto de vida-livre. Ou ainda, outras larvas rabditóides, ao final de dois a cinco dias se diferenciam em macho e fêmea de vida livre. O encontro dos adultos favorece o acasalamento e, posteriormente a fêmea deposita os ovos no solo, e estes se desenvolvem rapidamente liberando larvas rabditóides que por sua vez evoluem para larvas filarióides, as quais retornam ao parasitismo (GROVE, 1996).

No ciclo de vida parasitário, as larvas filarióides quando em contato com a pele ou mucosa oral ou esofágica do homem após deglutição de alimentos contaminados, secretam metaloproteases que auxiliam na penetração e na migração pelos tecidos atingindo os pequenos vasos sendo levadas pela circulação venosa até o lado direito do coração. A partir daí, por meio das artérias pulmonares, chegam aos capilares, penetram nos alvéolos e

ascendem até a traquéia levadas passivamente pelos cílios do epitélio respiratório, até a nasofaringe, onde são deglutidas alcançando, então, o duodeno, para se transformarem em fêmeas partenogenéticas e iniciarem a oviposição dando origem às larvas rabditóides (GROVE, 1996; CONCHA et al, 2005; COSTA-CRUZ, 2000; MARUYAMA et al, 2000).

A explicação mais conhecida para a ocorrência desses dois ciclos evolutivos, ambos monoxênicos, é a constituição genética das fêmeas partenogenéticas que são triplóides ($3n$) e podem produzir simultaneamente três tipos de ovos que darão origem a três tipos de larvas rabditóides que de acordo com sua constituição cromossômica dará origem a machos (n) e fêmeas ($2n$) de vida livre e larvas filarióides infectantes ($3n$) (MONCOL, TRIANTOPHILLOU, 1978; SHIWAKU, 1988).

Machos e fêmeas de vida livre irão acasalar-se e originarão ovos triplóides ($3n$) dos quais irão eclodir larvas rabditóides triplóides que evoluirão para larvas filarióides ($3n$) infectantes, completando dessa forma o ciclo indireto.

A fêmea partenogenética parasita mede de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 30 a 40 μm de largura e possui o corpo cilíndrico com aspecto filiforme, extremidade anterior arredondada dotada de pequena abertura oral que se comunica com o esôfago longo e cilíndrico, que ocupa cerca de 25% do corpo do parasito e que se conecta ao intestino, reto e ânus. O aparelho genital é constituído por ovários, ovidutos, úteros, vagina e vulva situada no terço posterior do corpo e receptáculo seminal não visível. Em seu habitat normal a fêmea partenogenética localiza-se na parede do intestino

delgado, mergulhada nas glândulas de LieberKühn e na porção superior do jejuno, onde ocorre a postura dos ovos (CAMPOS; FERREIRA, 2005).

A fêmea de vida livre, encontrada no solo, também possui extremidade anterior arredondada e posterior afilada, porém, mede 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 50 a 70 μm de largura. O esôfago é curto e tem aspecto rãbitóide, o intestino é simples terminando no ânus. O aparelho genital é constituído de útero, ovários, ovidutos e vulva situada próxima ao meio do corpo, com presença do receptáculo seminal (GROVE, 1996)

O macho de vida livre, também encontrado no solo, possui extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Mede 0,7 mm de comprimento por 40 μm de largura. O esôfago é do tipo rãbitóide seguido de intestino e cloaca. O aparelho genital contém testículo, vesícula seminal, canal deferente e canal ejaculador que se abre na cloaca. Apresenta dois pequenos espículos, auxiliares na cópula, que se deslocam e são sustentados por uma estrutura quitinizada denominada gubernáculo (CAMPOS; FERREIRA, 2005)

Os ovos medem de 50-58 μm de comprimento por 30-34 μm de largura e apresentam uma casca bastante delgada. Em seu interior encontram-se as larvas de primeiro estágio (larvas rãbitóides). Raramente encontram-se ovos nas fezes do indivíduo parasitado, uma vez que as larvas eclodem muito rapidamente (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

As larvas rãbitóides medem de 280 a 310 μm de comprimento por 15 a 18 μm de largura. O esôfago (estrutura que dá nome ao tipo de larva por ser do tipo rãbitóide) é dividido em 3 partes: corpo, istmo e bulbo e ocupa 25 % do comprimento total do corpo da larva (80 a 94 μm de comprimento). Ao

esôfago seguem-se intestino, reto e ânus. A larva rabditóide apresenta vestíbulo bucal curto e primórdio genital conspicuo medindo em média 27 µm que está localizado ao lado do intestino no terço posterior do corpo da larva. A extremidade posterior (cauda) termina bruscamente e mede entre 40 e 60 µm.

As larvas filarióides (infectantes) são encontradas no solo e nas fezes. São oriundas de um processo de diferenciação da larva de segundo estágio. Medem de 400 a 700 µm de comprimento por 12 a 20 µm de largura. O esôfago é retilíneo e ocupa cerca de 40 a 45% do tamanho do corpo da larva. Ao esôfago seguem o intestino, reto e ânus. A cauda é característica desse estágio uma vez que se apresenta entalhada e mede cerca de 70 µm (CAMPOS; FERREIRA, 2005). As características morfológicas e morfométricas das larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis* são importantes parâmetros de definição da espécie do parasito em questão, sendo possível detectar grupos diferentes de *Strongyloides* por meio de comparações de medidas quando as espécies estão intimamente ligadas (LITTLE, 1966), no entanto, segundo TEIXEIRA, 1997, outros métodos, atrelados aos morfométricos e morfológicos, devem ser utilizados para melhor caracterizar as larvas desse parasito.

Os mecanismos de transmissão da estrogiloidíase humana giram em torno da heteroinfecção, modo mais frequente, em que ocorre penetração das larvas filarióides pela pele dos pés, mãos, região interdigital, nádegas e que em pouco tempo atingem a derme, circulação linfática e sanguínea e daí o coração, pulmões e intestino. A ingestão de água e alimentos contaminados com larvas filarióides também pode resultar em infecção. Outra forma de transmissão é através da auto-infecção que pode ser externa, quando ocorre penetração de larvas infectantes (filarióides) na região perianal de pacientes infectados, ou

interna, quando as larvas rabditóides que estão no intestino se desenvolvem rapidamente e dão origem a larvas filarióides que penetrarão na mucosa do íleo ou cólon dos indivíduos parasitados (FAUST, 1933; GROVE, 1996).

Nota-se, sobretudo, que devido à exacerbação dos mecanismos de auto-infecção, ocorra o aparecimento de formas graves ou fatais da estrogiloidíase humana e por conta disso houve o aparecimento dos termos “*estrogiloidíase disseminada*” e “*hiperinfecção*”, o primeiro termo refere-se à forma da doença em que se tem, além de uma elevação do número de vermes localizados em órgãos que fazem parte do ciclo normal de *S. stercoralis*, um aumento da carga parasitária em órgãos não usuais, muitas vezes com aparecimento de sépsis por bactérias Gram negativas que atravessam a parede do intestino (SHORMAN; AL-TAWFIQ, 2009); e o segundo, refere-se a uma aceleração do ciclo normal do parasito levando a um aumento da carga parasitária em órgãos do seu ciclo normal, ocasionando uma elevação da possibilidade da ocorrência do ciclo de auto-infecção interna (FARDET et al., 2006). Tal fato pode ocorrer, pois o paciente portador de estrogiloidose pode estar em situação de imunodepressão ou pode fazer uso de medicamentos corticoesteróides (fármacos usados como antiinflamatórios, imunossupressores e antialérgicos), cujos metabólitos, que são semelhantes ao hormônio ecdisona, aumentam a fecundidade das fêmeas partenogênicas e a maturação das larvas rabditóides em filarióides (GROVE, 1996; ZAGO-GOMES et al., 2002).

A hiperinfecção e a forma disseminada da estrogiloidíase são comumente observadas naqueles indivíduos com imunossupressão importante ocasionada por diversos fatores: uso contínuo de corticóides (KEISER; NUTMAN, 2004; FARDET et al., 2006), transplantes (STONE; SCHALFNER,

1990; STAINER et al., 2002), infecções pelo HIV (LUCAS, 1990) e pelo HTLV-1 (SATO et al., 2002), neoplasias (RIVERA et al., 1970), desnutrição (RON et al., 1992), alcoolismo (OLIVEIRA et al., 2002) e diabetes (MENDONÇA et al., 2006).

Há muitos relatos de encontro de larvas de *S. stercoralis* em amostras fecais caninas: na Nigéria 14,96% de 254 amostras apresentava larvas de *S. stercoralis* (UGOCHUKWU; EJIMADU, 1985); no nordeste da Índia, 2% de 101 cães apresentaram larvas desse parasito (TRAUB et al., 2002); no Japão foram relatadas larvas de *Strongyloides* sp. em 1,93% de 1505 cães domiciliados (ITOH et al., 2003); na cidade de Santiago no Chile foi registrada a presença de larvas de *S. stercoralis* em apenas uma amostra fecal de um cão em 1500 estudados (ALCAÍNO; TAGLE, 1970). Há evidências que linhagens de *Strongyloides* de cães podem infectar o homem, no entanto, a importância epidemiológica dos cães como transmissores de *S. stercoralis* para o homem ainda não está esclarecida (GEORGI; SPRINKE, 1974; GROVE; NORTHERN, 1982; RAMACHANDRAN et al., 1997). Porém, utilizando-se de métodos imunológicos para detecção de anticorpos no sangue dos animais demonstrou-se que *S. stercoralis* apresenta um grande potencial zoonótico (JUNIOR et al., 2006).

A estrogiloidíase humana pode se apresentar de forma aguda ou crônica. A forma aguda ocasiona reação inflamatória no local onde houve a penetração da larva, tosse, irritação traqueal e bronquite (devido à presença das larvas nos pulmões), diarreia, constipação, anorexia e dores abdominais e as larvas são detectadas nas fezes em três a quatro semanas após a infecção. A forma crônica é a mais comum e geralmente apresenta-se assintomática ou oligossintomática com manifestações gastrintestinais como vômitos, diarreia,

constipação e borborigmos; manifestações cutâneas como urticária e *larva currens*; asma e síndrome nefrótica além de obstruções intestinais. As infecções são mantidas por número muito pequeno de parasitos (GENTA, 1992; GRYSHECK; SICILIANO, 2005).

A infecção pelo *S. stercoralis* pode ser limitada, ao menos em parte, por mecanismos de defesa de mucosa, independentemente da resposta imune humoral ou celular devido à dessensibilização de mastócitos e conseqüente diminuição da produção de histamina no nível da mucosa, sugerindo que a defesa local mediada por mastócitos pode ser responsável pelo controle da intensidade da infecção tanto diretamente, pela capacidade dessas células de lesar os parasitos, quanto indiretamente, por meio da degranulação de substâncias que atraem e ativam os eosinófilos (DE PAOLA, 1962).

A longa permanência do parasito no hospedeiro humano (cronicidade) e a contínua passagem da larva filarióide pelos tecidos resultam em uma incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários. Proteínas de superfície e produtos de excreção/secreção das larvas infectantes são imunogênicos e levam a formação de anticorpos ou estimulam a degranulação de células efectoras por ação de IgE. Assim como em outras helmintíases, os eosinófilos e IgE desempenham papel importante na proteção ao hospedeiro (BRINDLEY et al., 1988)

O ciclo do parasito sugere que possa ser estimulada a resposta local e sistêmica mediada por anticorpos IgA . Sabe-se também que há interação entre as respostas imunes humoral e T dependente, que ocorre pela ação de citocinas: a atração de eosinófilos e a indução de IgA são mediadas pela IL-5. As células T respondem aos antígenos dos parasitos, e esses são danificados

por anticorpos e produtos dos mastócitos sensibilizados pela IgE, que degranulam após o contato com o antígeno e liberam histamina que, por sua vez, aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal. As interleucinas IL-4 e IL-13 provocam também o aumento da contração da musculatura lisa, e no mecanismo T-independente, moléculas inflamatórias inespecíficas, secretadas por macrófagos, incluindo TNF- α e IL-1, contribuem para a proliferação das células caliciformes e provocam aumento na secreção de muco, que reveste os parasitos e levam à sua expulsão (MARUYAMA et al., 2000; COSTA-CRUZ, 2005).

O diagnóstico laboratorial da estrogiloidíase humana se faz pelo encontro de larvas de *S. stercoralis* nas fezes, escarro, em outros líquidos orgânicos e por biópsias e necropsias.

Para o exame parasitológico de fezes devem ser utilizados métodos específicos que evidenciam o aparecimento das formas larvárias como os de BAERMANN, 1917, a modificação proposta por MORAES, 1948 é a mais empregada (BAERMANN- MORAES) e de RUGAI, MATTOS e BRISOLA, 1954 cujo princípio leva em consideração o termo e o hidrotropismo das larvas. São técnicas de execução simples e rápida para visualização das larvas, porém, o material fecal deve ser colhido sem conservantes. A liberação dos parasitos em pequenas quantidades e de forma irregular faz com que os métodos corriqueiramente utilizados na rotina dos laboratórios de parasitologia (LUTZ, 1919; HOFFMAN, PONZ e JANER, 1934 ou FAUST et al., 1938, dentre outros) não sejam adequados ao diagnóstico da estrogiloidíase humana. A identificação correta das larvas se faz necessário devido à semelhança com as larvas dos ancilostomídeos (DREYER et al., 1996).

Com a finalidade de aumentar a possibilidade diagnóstica, são empregadas diferentes técnicas de coprocultura, que se baseiam no desenvolvimento do ciclo indireto do parasito. A coprocultura pode ser realizada pelo método de LOOSS, 1898 (carvão vegetal), método de LITTLE, 1966 (papel de filtro em placa de Petri), método de HARADA e MORI, 1955 (papel de filtro em tubos) ou pelo método de cultura em placa de ágar (as fezes são semeadas em ágar contendo extrato de carne, NaCl e peptona). Esses métodos são limitados pela demora na obtenção dos resultados (5 a 7 dias) e pelo risco de infecção durante a manipulação de larvas infectantes (COSTA-CRUZ, 2000; ZAHA et al., 2000).

A pesquisa de larvas no escarro e também em outros líquidos orgânicos pode ser feita pelo exame direto do material clínico ou após centrifugação. A biópsia intestinal é realizada no duodeno, jejuno e íleo e a necropsia que possibilita o estudo de vários órgãos, é processada por técnicas histopatológicas de rotina. O hemograma pode auxiliar na suspeita diagnóstica quando apresenta elevação do número de eosinófilos. No entanto, em alguns casos de hiperinfecção e da forma disseminada da estrogiloidíase, a eosinofilia no sangue periférico não é encontrada (HANCOCK et al., 2001, BERK et al., 1987 e KIA et al., 2008)

Devido ao caráter crônico da estrogiloidíase humana, o emprego de métodos imunológicos para avaliação da resposta imune do hospedeiro nos casos assintomáticos, tem sido utilizado, inclusive, nos inquéritos soroepidemiológicos (SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998)

O tratamento da estrogiloidíase humana foi feito primeiramente com iodeto de ditiazanina, que devido suas propriedades tóxicas, não é mais utilizado. O mebendazol em doses usuais não tem se mostrado ativo contra o *S. stercoralis*. O tiabendazol é considerado hoje o fármaco de escolha para o tratamento dessa parasitose (ZAHA et al., 2000). O albendazol, anti-helmíntico de amplo espectro, utilizado na terapêutica de várias parasitoses intestinais e extra-intestinais, não se mostrou ativo em dose única no tratamento da estrogiloidíase, entretanto com uma dose diária de 800 mg/ 3 dias, foi observado que a cura parasitológica pode chegar a 90%, porém faltam estudos que comprovem sua eficácia terapêutica na estrogiloidíase disseminada (ARCHIBALD et al., 1993).

O cambendazol, um derivado benzimidazólico, de fórmula estrutural muito semelhante à do tiabendazol, mostrou-se bastante potente contra *S. stercoralis*, destituído de toxicidade sobre as funções hematopoiéticas, hepáticas e renais, na posologia empregada de 5 mg/kg de peso corpóreo (BARANSKI et al., 1978)

Recentemente no Brasil foi liberado o uso do fármaco ivermectina que é altamente ativo contra o *S. stercoralis* com índices de cura semelhantes aos observados quando se utiliza o tiabendazol. Nos casos de estrogiloidíase disseminada, particularmente nos pacientes portadores do vírus HIV, a ivermectina é empregada num esquema de multidoses (200 µg/kg nos dias 1, 2, 15 e 16) tendo sido documentada a cura clínica e parasitológica de praticamente todos os pacientes (CELEDON et al., 1994).

É importante salientar que para o tratamento da estrogiloidíase disseminada deve-se administrar além do antiparasitário um fármaco

antimicrobiano com espectro para bactérias Gram-negativas, já que a septicemia bacteriana acompanha sobremaneira a migração larvária pelo organismo. O controle de cura é realizado por meio de exames parasitológicos de fezes pelo método de BAERMANN-MORAES, 1948 nos dias 7, 14 e 21 após o tratamento (ZAHA et al., 2000).

I. 3 – Aspectos moleculares:

Diversos trabalhos estão sendo realizados para se determinar sequências de genes desse parasito, inclusive com o objetivo de que possam vir a ser utilizadas no diagnóstico, por meio de variantes de métodos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PUTLAND et al., 1993; MOORE et al., 1996; DORRIS; BLAXTER, 2000; MASSEY et al., 2001, GALLEGO et al., 2005).

Nos eucariotos, os genes que codificam o RNA ribossômico estão organizados em unidades repetidas em tandem agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (Figura 03). Cada unidade possui sequencias codificadoras altamente conservadas e sequencias intercalares que, em geral, variam dentro e entre populações. De maneira geral, cada unidade do rDNA eucarionte consiste de: um espaçador externo (ETS, do inglês *external transcribed spacer*), transcrito em uma sequencia que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNAr; uma região que codifica para o RNAr 18S; um espaçador interno que é transcrito (ITS1, do inglês *internal transcribed spacer*); a região que codifica o RNAr 5.8S; outro espaçador interno (ITS2); uma região que codifica para o RNAr 28S e um espaçador externo (NTS, do inglês *non transcribed spacer*), que não é transcrito (FLAVELL e O'DELL, 1979; LONG

e DAWID, 1980; ELDER e TURNER, 1995); as cópias das unidades de repetição do rDNA são separadas pelo espaçador não-transcrito (NTS). Os espaçadores reconhecem sinais para processar a transcrição do RNAr (HILLIS e DIXON, 1991). A região dos espaçadores (ITS) apresenta uma alta taxa de divergência quando comparada com as sequências codificadoras dos RNAr 18S, 5.8S e 28S (SCHLÖTTERER, et al., 1994).

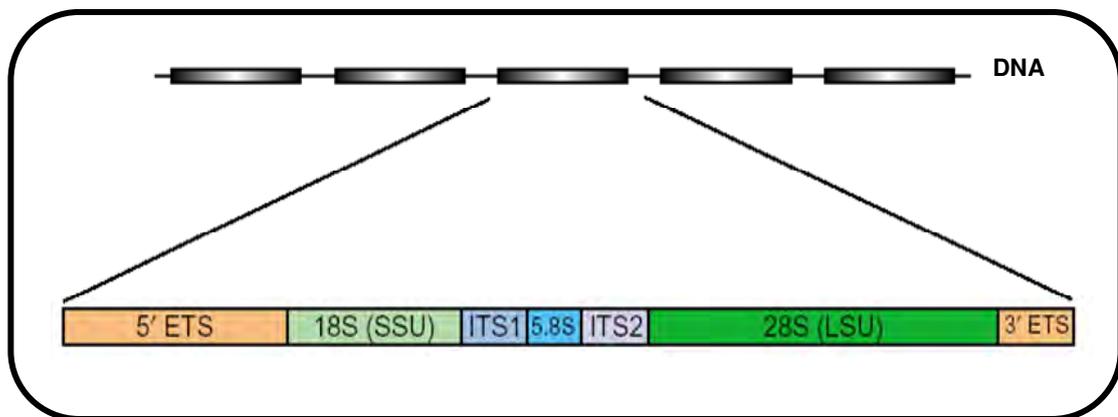


Figura 03 – Esquema da organização do DNA ribossomal típico de eucarioto (COLEMAN, 2003).

Pouco se sabe sobre a variabilidade genética de *S. stercoralis* e sua influência no processo de infecção. No entanto, vários marcadores moleculares podem ser explorados para fornecer informações sobre variabilidade genética nesses organismos por meio de detecção de polimorfismos de DNA. Atualmente há várias técnicas disponíveis tais como ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses) (VENTURA et al., 2001), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (GASER et al., 1996), Sequências de subunidades do rDNA (MONTI et al., 1998), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (WU et al., 1999), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) (RODRIGUEZ-TRELLES et al.,

2000). Entre essas, o RAPD surgiu com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), sendo baseada na amplificação simultânea de vários *loci* anônimos dispersos no genoma, utilizando um único par de *primers* de sequências de bases aleatórias que se anelam em vários pontos do genoma. A amplificação de um determinado fragmento do genoma ocorre quando dois sítios de homologia ao *primer* estão adjacentes (<4000 pares de base) e em orientação invertida.

Marcadores moleculares como RAPD têm sido empregados em vários organismos para avaliação da variabilidade genética, estudos de populações (WU et al, 1999), identificação taxonômica (RODRIGUEZ-TRELLES et al., 2000), e produção de *fingerprinting* genômicos para inúmeras espécies de microorganismos (WELSH; MCCLELLAND, 1990).

A PCR-RFLP foi usada para diferenciar várias espécies de *Strongyloides*, porém, em 1997 RAMACHANDRAN et al., verificaram que para quatro isolados humanos de regiões geográficas distintas do mundo, houve padrões de restrição idênticos com as nove enzimas de restrição utilizadas.

Os espaçadores podem ser usados para inferir filogenia entre espécies próximas, para identificação de espécies ou linhagens, para estudos de hibridização e como marcadores em genética populacional (HILLIS; DIXON, 1991).

Estudos com 100 espécies das ordens Strongylida e Ascaridida mostraram que a magnitude da variabilidade das sequências dentro da mesma espécie, independentemente da etapa de desenvolvimento, gênero ou origem geográfica, foi significativamente menor que as diferenças entre as espécies (HOST et al., 1995; HUNG et al., 2000). Isso indica que o uso de sequências da

região ITS para identificação específica de nematódeos parasitos é extremamente valioso, uma vez que se trata de uma região altamente polimórfica.

NILFOROUSHAN et al., 2007 e KIA et al., 2008 utilizaram o sequenciamento do gene ITS-1 do rDNA para identificar *S. stercoralis* isolados de espécimes fecais humanos de diversas áreas endêmicas do Irã, que se mostrou extremamente sensível.

I. 4 – Justificativa:

Araraquara, município sede da Região Administrativa Central do Estado de São Paulo, tem uma população de cerca de 195820 pessoas. O Sistema de Abastecimento de Água da cidade atende 100% da população por meio da captação de águas superficiais e de poços profundos. As ligações de esgoto atendem a 99% da população araraquarense. Com base nesses dados pode-se inferir que se trata de uma cidade em que os problemas atrelados as parasitoses humanas estão devidamente controlados, porém há dados que mostram cerca de 26 óbitos por ano, devido às doenças infecciosas e parasitárias na cidade (IBGE, 2007).

Partindo desse princípio e de que existe, ainda nos dias atuais, uma considerável frequência de enteroparasitoses nessa região (MINÉ; ROSA, 2008), o presente trabalho pretende determinar, por meio das metodologias descritas a seguir, a prevalência do nematódeo *S. stercoralis* e de outros eventuais enteroparasitas, bem como a sua sazonalidade na região de Araraquara – SP, fornecendo dados estatísticos para enfrentar o problema de maneira eficaz.

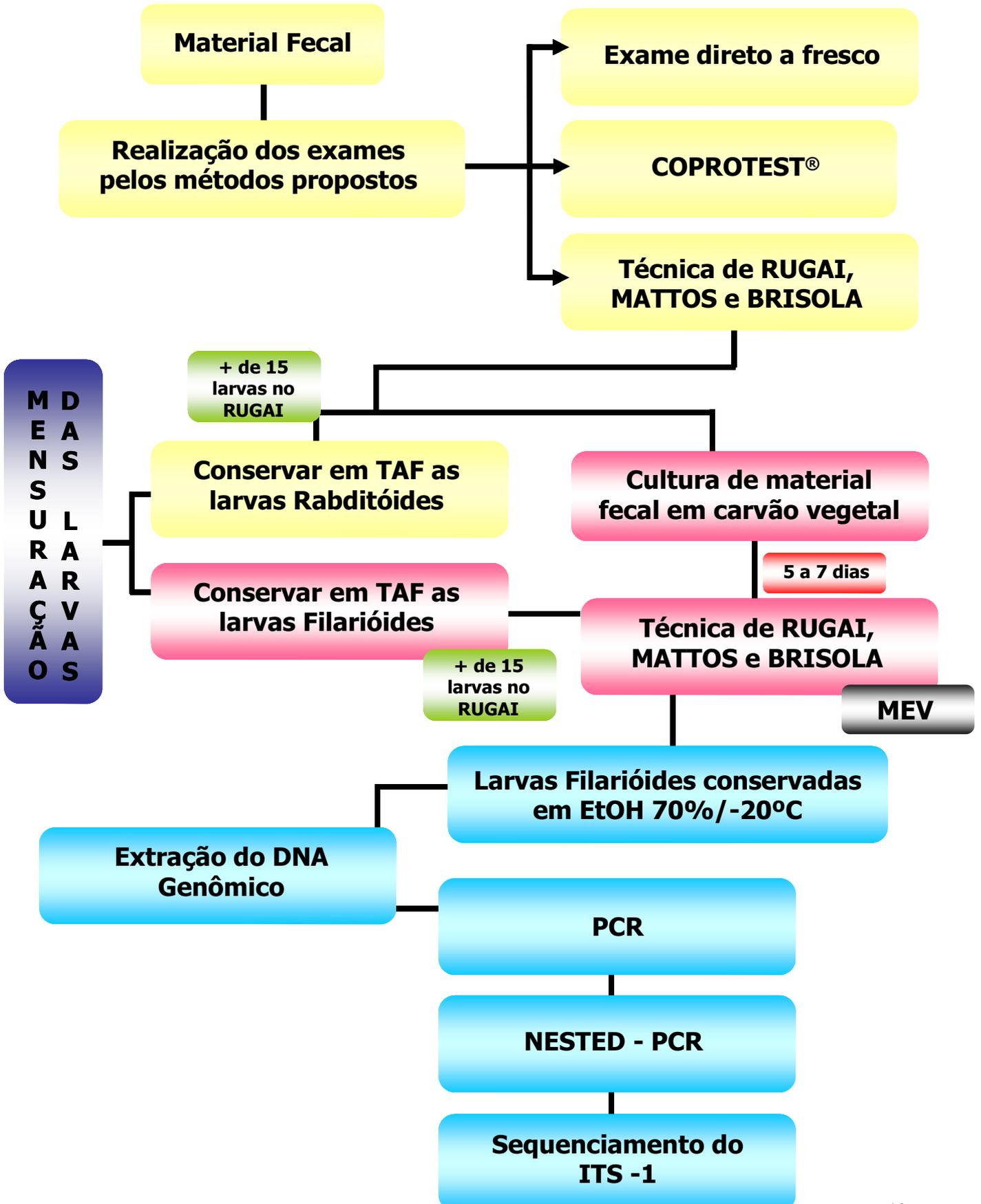
Além disso, pelo fato de que os pacientes que se apresentam parasitados pelo *S. stercoralis* poderem ou não apresentar sintomatologia, uma vez que a presença de sintomatologia nessa infecção é dependente do grau de parasitismo, estado imune do hospedeiro e da fase da infecção, pretende-se realizar estudos de morfologia e morfometria das larvas isoladas dos pacientes infectados atrelando esses estudos a técnicas de biologia molecular com o intuito de caracterizar diferentes cepas desse parasito.

II – OBJETIVOS

- Isolar cepas de *S. stercoralis* de fezes de pessoas com e sem sintomatologia da região de Araraquara – SP;
- Estudar a frequência de *S. stercoralis* em fezes das pessoas que procuram o Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, bem como de outros eventuais parasitos intestinais;
- Correlacionar sintomatologia, idade, sexo e procedência de pessoas portadoras de *S. stercoralis* com as características das cepas isoladas.
- Observar a sazonalidade de parasitismo por *S. stercoralis* dentre as pessoas que procuram o NAC;
- Proceder a estudos morfométricos de larvas rabdtóides e filarióides de cepas de *S. stercoralis*;
- Realizar estudo molecular de cepas de *S. stercoralis* isoladas de pessoas com e sem sintomatologia por meio da técnica de NESTED-PCR e do sequenciamento do Espaçador Transcrito Interno (ITS1) do DNA ribossomal.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III. 1 – Fluxograma de Trabalho:



III. 2 – Estudos Epidemiológicos (Exames Laboratoriais, Coleta dos dados dos voluntários da Pesquisa e Avaliação da Sazonalidade do Aparecimento de *S. stercoralis*):

Os exames parasitológicos de fezes de pacientes provenientes de diversas cidades da região de Araraquara foram feitos no Laboratório de Parasitologia Clínica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP e no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara. Durante os meses de abril de 2006 a janeiro de 2009, diariamente, verificou-se a ocorrência de *S. stercoralis* nas amostras fecais examinados nesses laboratórios, bem como a presença de outros enteroparasitas. De janeiro de 2005 a março de 2006, avaliamos a frequência de parasitos entéricos nos prontuários de exames realizados nos laboratórios, bem como os sintomas relatados pelos pacientes.

Após breve abordagem para explicação sobre este projeto de pesquisa e procedimentos laboratoriais a serem adotados, os voluntários assinaram termo de consentimento que permitia o uso dos espécimes fecais.

Os métodos utilizados para a realização dos exames coproparasitológicos foram: Exame Direto a fresco, com a finalidade de observar os trofozoítos vivos dos protozoários bem como cistos, oocistos, ovos e larvas dos enteroparasitas, COPROTEST® cujo fundamento é a centrífugo-sedimentação de elementos parasitários em um sistema água-acetato de etila (AMATO NETO et al., 1989) e a técnica de RUGAI, MATTOS e BRISOLA, 1954, que é fundamentada no termo e hidrotropismo das larvas dos nematódeos e na

sua tendência de sedimentar espontaneamente, quando se encontram em água aquecida a 42° C (40 a 45° C).

Todas as amostras positivas na técnica de RUGAI, MATTOS e BRISOLA, 1954 foram separadas com o intuito de se realizar a mensuração das larvas rabditóides (apenas as amostras que apresentavam 15 ou mais larvas) e para a realização da coprocultura cujo objetivo era o de se ter larvas filarióides em grande número para fazer a mensuração das mesmas e caracterizá-las por meio de técnicas de biologia molecular.

Foi realizada a coprocultura pelo método de LOSS, 1898, modificado que consiste em se misturar uma porção de fezes com água e carvão mineral, essa mistura é colocada em placas de Petri fechadas que contem um pedaço circular de papel de filtro em sua base para manter a umidade no ambiente, que são deixadas à temperatura ambiente durante 5 a 7 dias. Para recuperar as larvas filarióides é realizada a técnica de RUGAI, MATTOS e BRISOLA, 1954.

Para realização do estudo da sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis*, dados de temperatura e precipitação da região de Araraquara foram disponibilizados pela Defesa Civil do Estado de São Paulo para que fosse possível correlacioná-los com o aparecimento de larvas do referido parasito nos exames realizados.

III. 3 – Descrição das Metodologias utilizadas para a realização dos Exames de Fezes e para a coprocultura:

Com vistas ao diagnóstico laboratorial da infecção humana por *S. stercoralis*, foram utilizados métodos de concentração e o exame direto a fresco

do material fecal. Tais métodos são empregados corriqueiramente em laboratórios de Parasitologia visando a detecção de larvas de *S. stercoralis* e de outros eventuais parasitos, protozoários e helmintos, que podem ser encontrados nas fezes humanas.

III. 3. 1 – Exame direto a fresco:

Método simples e eficiente para exame de fezes, que permite observar trofozoítos vivos dos protozoários e também permite ao microscopista ter uma visão geral do material que será analisado (ovos e larvas dos helmintos e cistos, oocistos e trofozoítos dos protozoários).

Procedimento:

1. Obteve-se pequena porção de fezes, de vários pontos da amostra fecal, colocou-se sobre uma lâmina de microscopia e homogeneizou-se com solução fisiológica e observou-se ao microscópio.

III. 3. 2 – Coprotest®:

Método fundamentado no processo de centrífugo-sedimentação de elementos parasitários em um sistema água-acetato de etila. É indicado para a pesquisa de ovos e cistos. (AMATO NETO et al., 1989)

Procedimento:

1. Colocou-se uma porção de fezes no frasco coletor com um pouco de água e agitou-se para homogeneização da suspensão fecal;
2. Introduziu-se o bico do frasco coletor num tubo de centrifuga de 15 mL, coletou-se 7 mL da suspensão fecal nesse tubo;

3. Adicionou-se à suspensão fecal 1 gota de detergente comercial e 3 mL de acetato de etila;
4. Tamparam-se os tubos de centrifuga e agitou-se vigorosamente por 10 segundos; centrifugou-se por 2 minutos a 2.000 rpm;
5. Após a centrifugação formam-se 4 fases. Descartou-se as 3 fases superiores e o precipitado foi lavado com água por meio de centrifugação por 2 minutos a 2.000 rpm;
6. Descartou-se o sobrenadante e colocou-se lugol em contato com o precipitado para confecção de lâminas que foram observadas ao microscópio.

III. 3. 3 – Método de RUGAI, MATTOS e BRIZOLA:

É fundamentado no termo e hidrotropismo das larvas dos nematódeos e na sua tendência de sedimentar espontaneamente, quando se encontram em água aquecida a 42° C (40 a 45° C).

Procedimento:

1. Estendeu-se sobre a boca da latinha contendo as fezes um pedaço de gaze dobrada 2 a 4 vezes, conforme a consistência das fezes, e repuxou-se as extremidades da gaze para trás da lata, formando uma "trouxinha".
2. Emborcou-se a "trouxinha" com a abertura voltada para baixo em cálice cônico com capacidade de 125 mL, fixando-a por pressão contra as paredes, em posição levemente inclinada.
3. Encheu-se o cálice com água aquecida a 45° C (42° C no interior do cálice), até que o nível de água alcance as fezes contidas na "trouxinha" emborcada.

4. Deixou-se em repouso cerca de 90 minutos. As larvas, quando presentes, dirigiam-se para o fundo do cálice.
5. Sem retirar a “trouxinha”, introduziu-se até o fundo do cálice um canudinho; deixou-se penetrar rapidamente no canudinho cerca de 3 mL de líquido, fechou-se novamente o canudo e depositou-se o material coletado em vidro de relógio e observou-se em microscópio com pequeno aumento (objetiva de 4 a 5 vezes).

III. 3. 4 – Coprocultura em Carvão Vegetal Ativado (Método de Loss modificado):

Método indicado para o isolamento de larvas infectantes de ancilostomídeos, *S. stercoralis* e *Trichostrongylus*. A mistura do material fecal e o carvão granulado simulam as condições encontradas no solo na natureza (DE CARLI, 2007).

Procedimento:

1. Misturou-se 20 a 40 g de fezes com água destilada para que se produzisse uma suspensão fecal espessa e uma quantidade 3 vezes maior de carvão vegetal ativado granulado; transferiu-se o preparado para uma placa de Petri com papel de filtro umidecido;
2. Fechou-se a placa de Petri, deixando-a no escuro à temperatura ambiente (25 a 28°C) durante 5 a 7 dias. Supervisionou-se diariamente a cultura para controlar a umidade.
3. Para concentrar as larvas infectantes, realizou-se a técnica de Rugai, Mattos e Brisola, anteriormente descrita.

III. 4 – Estudo Morfológico e Morfométrico das Larvas Rabditóides e Filarióides de *S. stercoralis*:

As larvas rabditóides encontradas nas fezes e as larvas filarióides obtidas em cultura foram fixadas em líquido conservador de larvas (TAF – 2mL trietanolamina, 7mL formol 40% e água destilada q.s.p. 100mL) para posterior mensuração. Somente amostras positivas para *S. stercoralis* que continham 15 ou mais larvas rabditóides provenientes das fezes dos pacientes e com o mesmo número de larvas filarióides provenientes da coprocultura, recuperadas pela técnica de RUGAI, MATTOS e BRISOLA, 1954, foram consideradas para este estudo (CORREA et al., 1979).

Os parâmetros utilizados para a mensuração das larvas foram os mesmos utilizados por TEIXEIRA, 1997:

Para larvas rabditóides: **CTr** – Comprimento Total; **CCr** – Comprimento da Cauda (distância do ânus à cauda); **CEr** – Comprimento do Esôfago; **CPr** – Comprimento do Primórdio Genital; **DPCr** – Distância do Primórdio Genital à cauda) e **Lr** – Largura. **Para larvas filarióides:** **CTf** – Comprimento Total; **CCf** – Comprimento da Cauda (distância do ânus à cauda); **CEf** – Comprimento do Esôfago; **Lf** – Largura. Além desses parâmetros, foram mensurados o Comprimento do Vestíbulo Bucal (**VBr**) e a área do Primórdio Genital (**APri**) das larvas Rabditóides, cujas medidas não foram relatadas em trabalhos anteriores.

As larvas rabditóides e filarióides foram observadas ao microscópio óptico Leica Leitz DMRXE, que está acoplado a uma câmera filmadora Moticam 2000, onde foi realizada a captura das imagens e as mensurações das mesmas por meio do programa Motic Images Advanced 3.2 (Figuras 04 e 05).

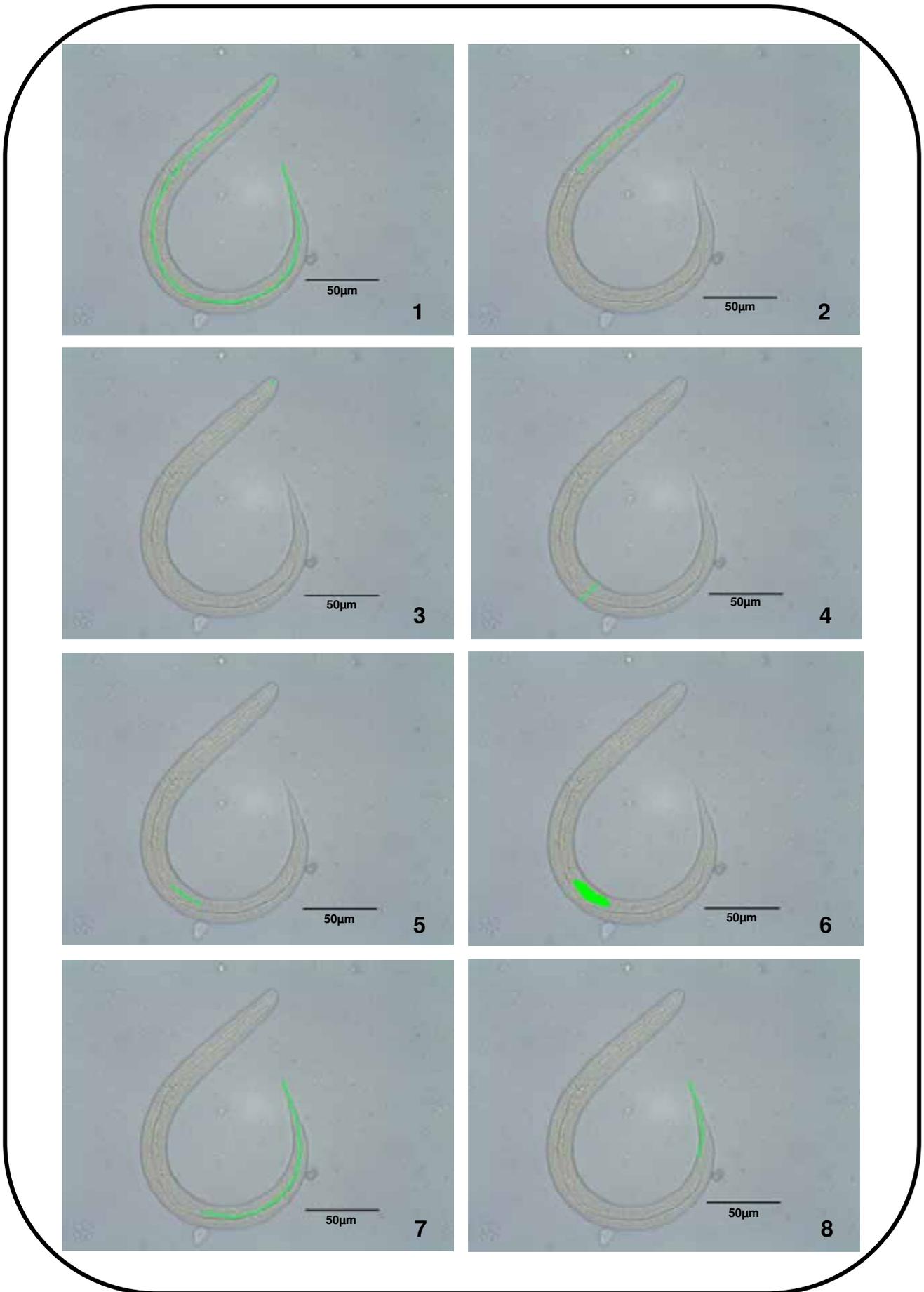


Figura 04 – Fotomicrografias das larvas rabbitóides (1 – Comprimento Total; 2 – Comprimento do Esôfago; 3 – Comprimento do Vestíbulo Bucal; 4 – Largura; 5 – Comprimento do Primórdio Genital; 6 – Área do Primórdio Genital; 7 – Distância do Primórdio Genital à Cauda; 8 – Comprimento da Cauda). Aumento de 400X. 55

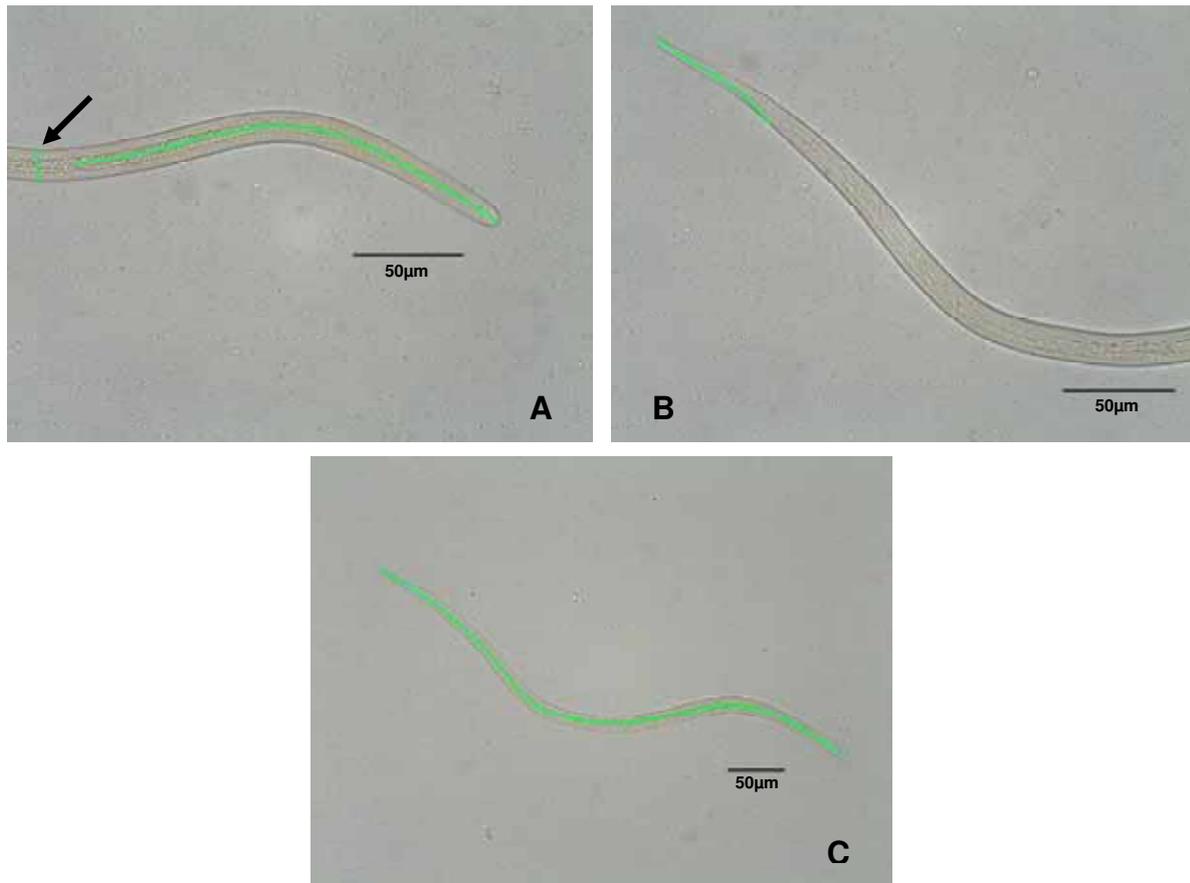


Figura 05 – Fotomicrografias das larvas filarióides (A – Comprimento do Esôfago e Largura (seta); B – Comprimento da Cauda – Aumento de 400X; C – Comprimento Total – Aumento de 200X).

III. 5 – Estudo Morfológico por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

As larvas filarióides de *S. stercoralis* foram coletadas da cultura e fixadas em tampão fosfato com solução de glutaraldeído 2% (SATO, 2008). Lamínulas de vidro foram fixadas em suportes metálicos com fita adesiva dupla-face transparente e sobre elas colocaram-se as larvas. As amostras foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potencia de 10 mA em aparelho da marca Edwards.

Após a metalização as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Topcon – SM-300.

III. 6 – Caracterização Molecular (NESTED PCR e Sequenciamento do ITS-1 do rDNA):

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas de 400 a 1000 larvas filarióides isoladas de cultura em carvão mineral e conservadas em álcool 70% a -20°C até o momento do uso, segundo protocolo proposto por NILFOROUSHAN et al., 2007, com algumas modificações. A estimativa da concentração do DNA genômico é feita por meio do protocolo executado por NAEGELE et al., 2006, que consiste na diluição da amostra a 1:100 em água tipo 1 autoclavada e realização de leituras em espectrofotômetro das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260nm para detecção do DNA, 280nm para proteínas e 330nm para fenol. A estimativa de pureza da preparação é dada pela relação da absorvância do DNA/proteína, que deve estar entre 1,8-2,0 (SAMBROOK et al., 1989).

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™, com um volume final de 50µL com os seguintes componentes:

- ~100 ng de DNAg (molde);
- 100 µM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP);
- 10 picomols de cada iniciador (*primer*);
- 2 mM de cloreto de magnésio;
- 1U de enzima Taq DNA Polimerase (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*) (Fermentas).
- tampão 10X.

Foram utilizados os *primers* descritos por NILFOROUSHAN et al., 2007 para amplificar o espaçador interno transcrito – 1 (ITS-1), sendo esperada a amplificação de fragmento de 750pb:

Forward: SS-F0 5' – ATC CTT CCA ATC GCT GTT GT – 3'

Reverse: SS-R0 5' – TTT CGT GAT GGG CTA ATC CC – 3'

As condições para a amplificação do ITS-1(rDNA) (NILFOROUSHAN et al., 2007), foram:

- 94° C por 5 minutos
 - 94°C por 45 segundos
 - 58°C por 1 minuto
 - 72°C por 1 minuto
 - 72°C por 5 minutos
- } 35 vezes

Partindo-se do produto da PCR, realizou-se a NESTED PCR com os primers e condições descritos por NILFOROUSHAN et al., 2007, sendo esperada a amplificação de fragmento de 680pb:

Forward: SS-F1 5' – GTA ACA AGG TTT TCG TAG GTG A – 3'

Reverse: SS-R1 5' – ATT TAG TTT CTT TTC CTC CGC TT – 3'

As condições da NESTED PCR foram:

- 94° C por 2 minutos
 - 94°C por 45 segundos
 - 60°C por 45 segundos
 - 72°C por 1 minuto
 - 72°C por 5 minutos
- } 40 vezes

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, formado por todos os compostos da reação, com exceção do DNA genômico,

cujo volume foi substituído por água tipo 1 estéril. A confirmação da reação de amplificação foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corada com brometo de etídio e observada em luz UV.

Os fragmentos amplificados foram purificados por meio do Illustra GFX DNA and Band Purification Kit (GE Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante, para em seguida serem submetidos à reação de sequenciamento.

Os produtos da NESTD PCR obtidos foram sequenciados a partir das duas extremidades para gerar sequências consenso. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye™ V1.0 (DNA Sequencing Kit, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems) com modificações no protocolo proposto pelo fabricante. Para o sequenciamento foram utilizados 2,0 µL de Big Dye 1.0; 2,0 µL de Save Money (200 mM Tris-HCl pH9,0 + 5 mM MgCl₂); 2,0 µL *primer* F/R 1.6 pmol/µL; 2,0 µL do produto purificado e 2,0 µL de água tipo 1 estéril totalizando 10,0 µL de reação.

As condições da PCR de sequenciamento foram:

- 92° C por 2 minutos
 - 96°C por 30 segundos
 - 52°C por 30 segundos
 - 60°C por 4 minutos
- } 40 vezes

O produto da PCR de sequenciamento foi precipitado da seguinte forma: adicionou-se 80 µL de Isopropanol 75% sobre o produto da PCR e as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Após o período de incubação foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm à TA. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1,0

mL de etanol 70% ao *pellet*, seguiu-se com uma centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos à TA, para ser lavado. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco no *speedy vaccum* por 10 minutos. As amostras foram ressuspensas em 2,0 µL de *Loading buffer* (12,3 µL de pré-mix + 57,7 µL de formamida) momentos antes de serem processadas no sequenciador automático ABI-377.

As sequências de DNA obtidas foram analisadas com o auxílio do software “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.5*” (HALL, 1999). A qualidade das sequências obtidas foi verificada por meio de eletroferograma. O alinhamento das sequências geradas foi feito no programa Clustal W (HALL, 1999).

III. 7 – Análises Estatísticas:

Os programas GraphPad InStat 3 e GraphPad Prism 5 foram utilizados para realização das análises de correlação entre os parâmetros mensurados para as larvas rabditóides e filarióides, sendo que o primeiro mostrou que a distribuição dos parâmetros correlacionados não apresentou distribuição gaussiana, sendo então mais adequada a realização da análise de correlação por meio do teste de Spearman que foi feita no segundo programa no qual procederam-se os cálculos dos índices de correlação e os valores de p que indicaram se os parâmetros relacionavam-se, com nível de significância de 95%.

Os dados epidemiológicos foram analisados pelo programa GraphPad InStat 3 em tabelas de contingências usando o teste de Chi-quadrado.

IV – RESULTADOS

Foram examinadas 19905 amostras de fezes destinadas aos Laboratórios de Parasitologia Clínica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP e de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara de pacientes de ambos os sexos, de diferentes idades e procedências, no período de Janeiro de 2005 a Janeiro de 2009.

As amostras examinadas eram de habitantes de diversos municípios da região de Araraquara, a saber: Araraquara (9156 – 46,00%), Américo Brasiliense (6171 – 31,00%), Motuca (677 – 3,40%), Rincão (1992 – 10,00%), Gavião Peixoto (1393 – 7,00%), Santa Lúcia (139 – 0,70%), Nova Europa (258 – 1,30%) e Taquaritinga (119 – 0,60%) (Figuras 06 e 07).



Figura 06 – Limites dos municípios da Região Administrativa Central do Estado de São Paulo. Em destaque, os municípios de onde os voluntários da pesquisa são oriundos (adaptado de www.cidadespaulistas.com.br)

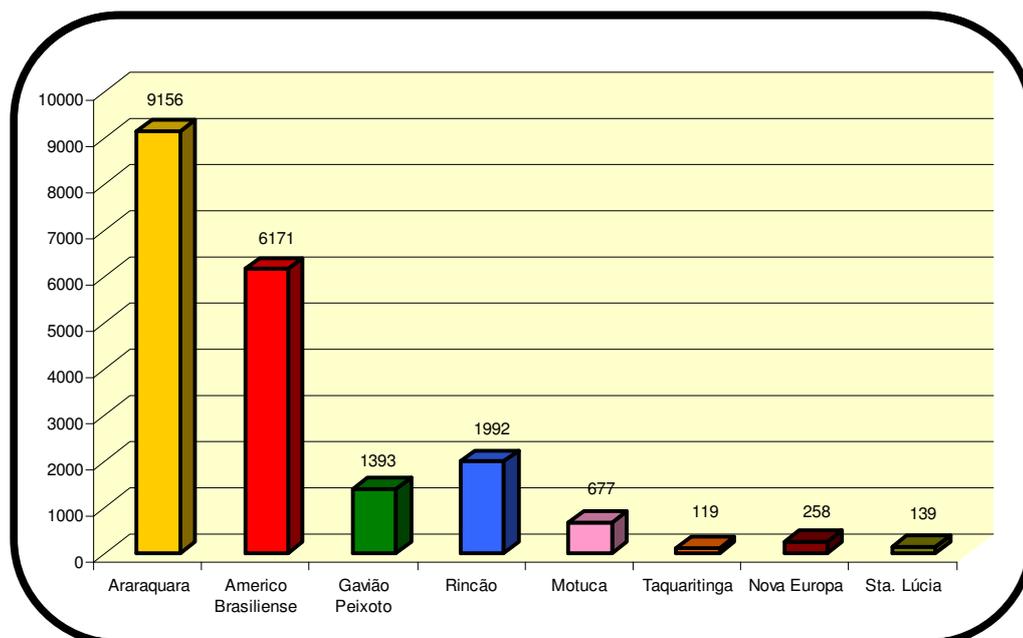


Figura 07 – Procedência das amostras enviadas para exame. Araraquara, 2005 – 2009.

Dentre as 19905 amostras fecais examinadas, 13102 eram de pessoas do sexo feminino e 6803 do sexo masculino, correspondendo a 65,82% e 35,4% do total de voluntários da pesquisa, respectivamente.

Das 13102 mulheres que foram voluntárias desse trabalho, 5300 (40,4%) eram gestantes, e dessas, 1165 (21,98%) albergavam um ou mais enteroparasitas. O protozoário e o helminto mais frequentes foram, respectivamente, *Entamoeba coli* (64,63%) e *Strongyloides stercoralis* (14,50%) (Figura 08).

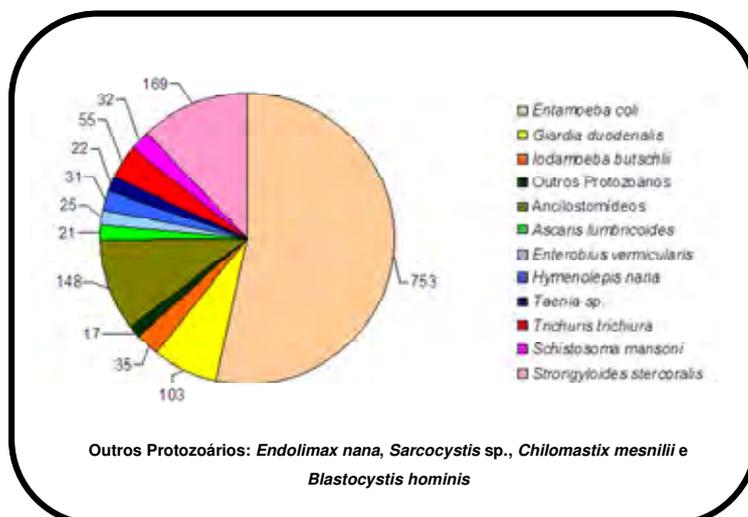


Figura 08 – Distribuição dos resultados positivos dos exames coproparasitológicos das gestantes (n = 1165) Araraquara, 2005 – 2009.

O material fecal foi submetido ao exame direto a fresco e às técnicas de concentração pelo método do Coprotest® e de RUGAI, MATTOS e BRIZOLA, que logo em seguida foi observado em microscopia óptica comum. Do total de amostras examinadas 3749 (18,83%) apresentaram-se positivas para a presença de enteroparasitas, sendo *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis*, *Strongyloides stercoralis* e Ancilostomídeos os protozoários e helmintos mais frequentes (Tabelas 01 e 02 e Figura 09).

Tabela 01 – Resultado dos exames coproparasitológicos realizados em Araraquara entre 2005 e 2009.

Resultados dos Exames	Frequência	%
Positivo	3749	18,83
Negativo	16156	81,27
TOTAL	19905	100

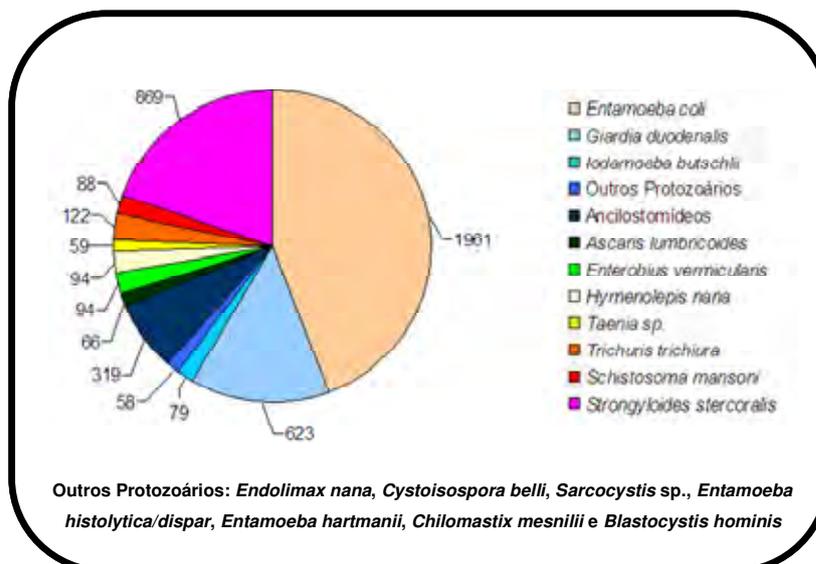


Figura 09 – Distribuição dos resultados positivos dos exames coproparasitológicos (n = 3749). Araraquara, 2005 – 2009.

Tabela 02 – Espécies de enteroparasitas encontrados em 19905 amostras fecais de pessoas residentes em oito municípios da região de Araraquara entre 2005 e 2009.

Parasitas Encontrados	Número de Amostras Positivas	% em Relação ao Total (n=19905)	% em Relação aos Positivos (n=3749)
<i>Blastocystis hominis</i>	9	0,05	0,24
<i>Chilomastix mesnili</i>	5	0,03	0,13
<i>Endolimax nana</i>	19	0,10	0,51
<i>Entamoeba coli</i>	1961	9,85	52,31
<i>Entamoeba hartmanii</i>	1	0,01	0,03
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	3	0,02	0,08
<i>Giardia duodenalis</i>	623	3,13	16,62
<i>Iodamoeba butschlii</i>	79	0,40	2,11
<i>Isospora belli</i>	6	0,03	0,16
<i>Sarcocystis sp.</i>	15	0,08	0,40
Ancilostomídeos	319	1,60	8,51
<i>Ascaris lumbricoides</i>	66	0,33	1,76
<i>Enterobius vermicularis</i>	94	0,47	2,51
<i>Hymenolepis nana</i>	94	0,47	2,51
<i>Taenia sp.</i>	59	0,30	1,57
<i>Trichuris trichiura</i>	122	0,61	3,25
<i>Schistosoma mansoni</i>	88	0,44	2,35
<i>Strongyloides stercoralis</i>	869	4,37	23,18

Das 3749 amostras positivas, 3199 apresentaram apenas um parasito intestinal e 550 dois ou mais enteroparasitas (Figura 10). A consistência das fezes analisadas foi observada e notou-se que das 19905 amostras trazidas ao laboratório 1911 (9,60%) apresentaram-se diarréicas; 10572 (53,11%) pastosas e 7422 (37,29%) formadas (Figura 11).

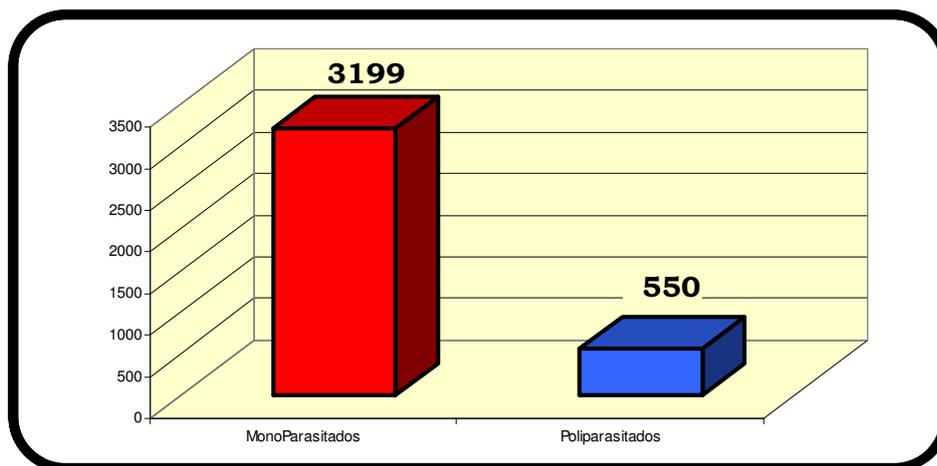


Figura 10 – Distribuição dos resultados positivos dos exames coparasitológicos (n = 3749). Araraquara, 2005 – 2009.

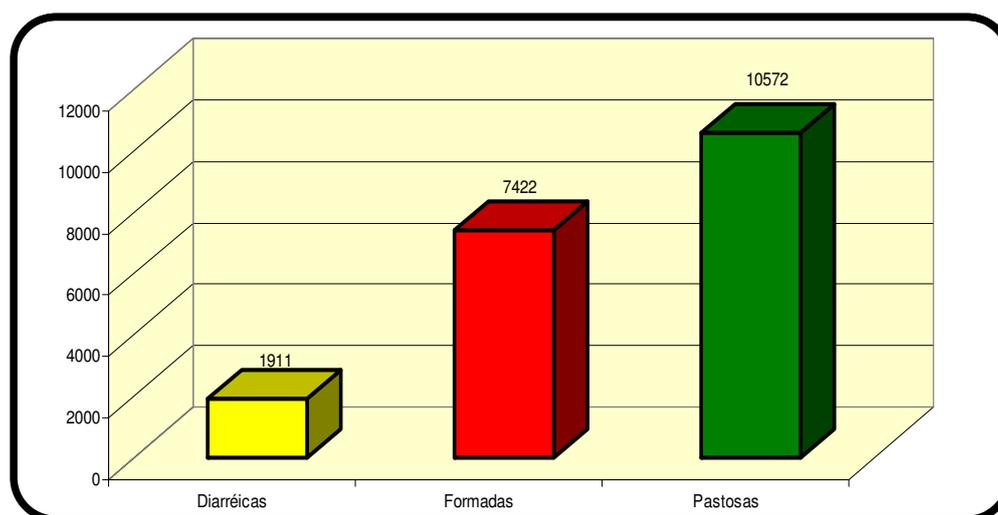


Figura 11 – Consistência das fezes examinadas (n=19905). Araraquara, 2005 – 2009.

Identificaram-se, por meio da técnica de RUGAI, MATTOS e BRIZOLA, 1954, 869 (4,37%) amostras positivas para *S. stercoralis*. Quando se comparou a frequência desse helminto em relação aos indivíduos participantes do presente estudo, obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os sexos: a frequência de homens parasitados (7,39%) foi maior do que a de mulheres parasitadas (2,79%) pelo *S. stercoralis*.

No entanto, quando se compara os pacientes portadores de *S. stercoralis* pelo sexo e idade, nota-se uma diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo que a frequência de infecção por esse parasito é maior nos indivíduos do sexo masculino, maiores de 40 anos (68,78%) assim como nas mulheres abaixo de 40 anos (73,77%), como se pode observar na Tabela 03.

Tabela 03 – Distribuição das faixas etárias segundo o sexo dos indivíduos portadores de *S. stercoralis*. Araraquara, 2005 – 2009.

Faixa etária	Amostras Positivas para <i>Strongyloides stercoralis</i>	
	Homens	Mulheres
0-9	13	13*
10-19	5	66*
20-29	36	120*
30-39	103	71*
40-49	157*	42
50-59	104*	23
60-69	51*	17
70-79	27*	10
80-89	7*	4
Total	503	366

* $p < 0.05$ para indivíduos do sexo masculino > 40 anos e do sexo feminino < 40 anos

Quando se comparou a procedência dos indivíduos participantes da pesquisa e dos portadores desse nematódeo, observou-se que havia diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos infectados procedentes do município de Araraquara e os infectados pelo *S. stercoralis* provenientes de

outras cidades da região estudada. Observa-se na Tabela 04 a origem dos indivíduos portadores de *S. stercoralis*.

Tabela 04 – Procedência dos indivíduos portadores de *S. stercoralis*. Araraquara, 2005 – 2009.

Município	Amostras Positivas para <i>S. stercoralis</i>	
	Frequencia	%
Araraquara	483*	55,58
Américo Brasiliense	291	33,48
Rincão	48	5,52
Gavião Peixoto	33	3,80
Motuca	8	0,92
Nova Europa	3	0,35
Taquaritinga	2	0,23
Santa Lúcia	1	0,12
TOTAL	869	100,00

* $p < 0.05$ para indivíduos procedentes de Araraquara.

Dos 3749 exames parasitológicos positivos, 856 eram de indivíduos que se queixavam de alguma sintomatologia (32,36% de diarreia; 60,16% dor abdominal e 7,48 tosse). Esses sintomas também foram relatados por 175 pacientes portadores de *S. stercoralis*. Quando se comparou os indivíduos positivos para algum enteroparasita em relação à presença ou ausência de sintomas e a positividade ou não para *S. stercoralis*, observou-se que há diferença estatisticamente significativa, sendo que a maioria dos indivíduos apresentou-se assintomáticos tanto na presença de *S. stercoralis* quanto na presença de outros enteroparasitas (77,18%), como se pode observar na Tabela 05.

Tabela 05 – Distribuição dos indivíduos portadores de enteroparasitas em relação à presença ou ausência de sintomas. Araraquara, 2005 – 2009.

Indivíduos	Amostras Positivas para Enteroparasitas	
	Com <i>S. stercoralis</i>	Sem <i>S. stercoralis</i>
Sintomáticos	175	681
Assintomáticos	694*	2199*
TOTAL	869	2880

*p<0,05 para os indivíduos assintomáticos e portadores de algum enteroparasita

Dentre os 869 indivíduos com *S. stercoralis*, 230 apresentavam-se co-infectados com outros enteroparasitas (82 homens e 148 mulheres), sendo que as associações mais frequentes foram com *Entamoeba coli* (34,8%), Ancilostomídeos (22,6%) e *Giardia duodenalis* (16,5%). Cabe ressaltar que dentre os indivíduos portadores de *S. stercoralis*, 71 eram portadores de tuberculose, 25 de diabetes e três do vírus HIV, situações extremamente delicadas e importantes devido à possibilidade de ocorrer hiperinfecção e disseminação desse nematódeo.

Quanto à sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis* nas fezes, foram analisadas as médias diárias de temperatura e de precipitação e confrontaram-se esses dados com a positividade para esse helminto nos exames realizados. De janeiro de 2005 a janeiro de 2009 houve 15 meses em que a frequência de *S. stercoralis* superou os 5,0%, chegando ao extremo de 8,2% em setembro de 2005.

A maioria dos meses com frequência de aparecimento de *S. stercoralis* > 5,0% foram meses com mais de 1/3 de dias com chuva e com temperatura máxima média de 30°C.

Porém a correlação entre a frequência de aparecimento de *S. stercoralis* com o número de dias chuvosos no mesmo mês (0,063) é mais baixa quando comparada com a mesma correlação feita para o número de dias chuvosos do mês anterior (0,126) o que justifica a presença de larvas infectantes no solo e favorece a transmissão desse parasito, como se pode notar nas Figuras 12 A e 12 B.

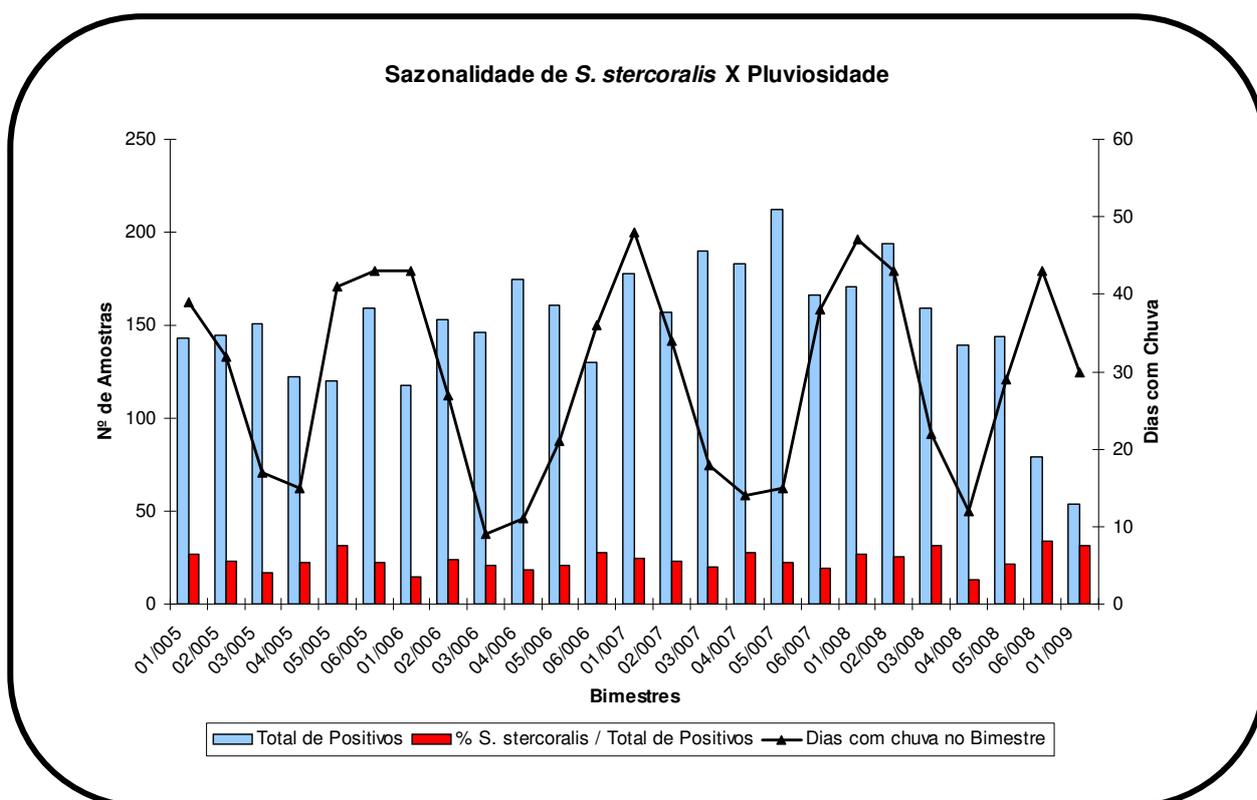


Figura 12 A – Distribuição da sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis* em relação aos dias com chuvas nos bimestres do período de Janeiro de 2005 e Janeiro de 2009.

Durante o período estudado, os meses de maio, junho e julho, tiveram médias de temperatura que oscilaram entre 18°C e 20°C. Nesses períodos, observamos diminuição do número de exames de fezes positivos para *S. stercoralis*.

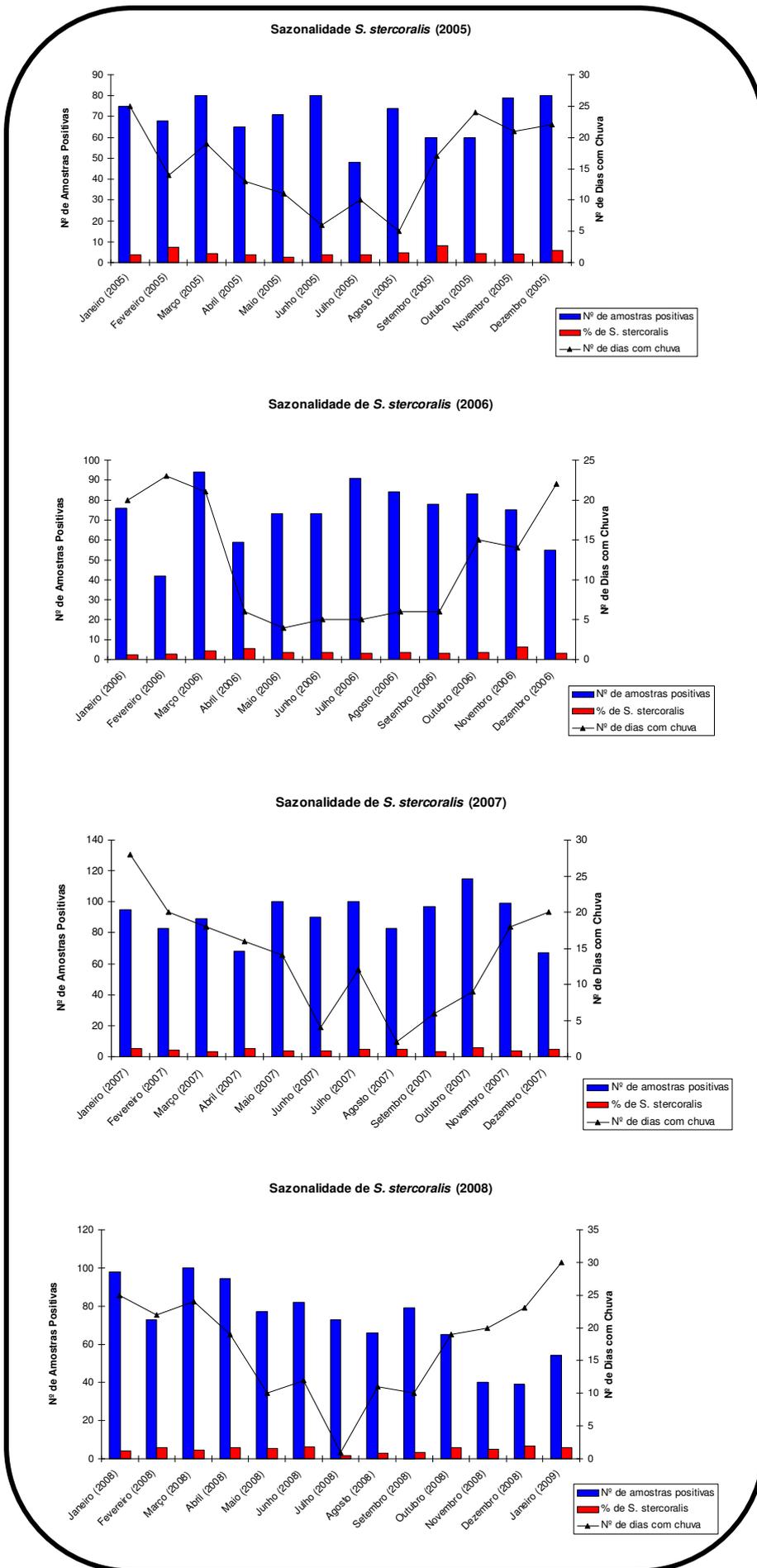


Figura 12 B – Distribuição da sazonalidade do aparecimento de *S. stercoralis* entre os meses de Janeiro de 2005 e Janeiro de 2009 em relação aos dias com chuva nesses meses.

Quando se analisa a quantidade de exames positivos para *S. stercoralis* reunindo os mesmos meses dos quatro anos estudados, observou-se que a região estudada, durante todo ano tem frequências de aparecimento desse parasito > que 5,0 %, como se pode notar na Tabela 06.

Tabela 06 – Frequência de exames positivos para *S. stercoralis* em cada mês durante os anos de 2005 a 2008.

Meses	2005	2006	2007	2008	Total	%
Janeiro	14 (387)	9 (359)	25 (459)	20 (503)	68	7,98
Fevereiro	24 (319)	8 (287)	19 (435)	26 (449)	77	9,04
Março	20 (466)	19 (418)	17 (505)	22 (476)	78	9,15
Abril	14 (394)	18 (327)	19 (369)	27 (458)	78	9,15
Mai	9 (341)	16 (447)	20 (542)	21 (392)	66	7,75
Junho	16 (417)	14 (396)	18 (468)	29 (475)	77	9,04
Julho	10 (282)	17 (515)	25 (512)	7 (452)	59	6,92
Agosto	17 (364)	15 (429)	25 (506)	11 (399)	68	7,98
Setembro	25 (304)	15 (449)	15 (489)	13 (396)	68	7,98
Outubro	13 (287)	18 (484)	33 (584)	18 (320)	82	9,62
Novembro	15 (366)	25 (403)	16 (466)	13 (272)	69	8,10
Dezembro	21 (350)	11 (332)	16 (339)	14 (211)	62	7,28
Total	198	185	248	221	852*	100

* N° total de exames positivos para *S. stercoralis* excluindo o mês de janeiro de 2009.
() – Total de exames naquele mês

Das 869 amostras positivas para *S. stercoralis*, 367 continham mais de 15 larvas rabditóides quando se examinava as fezes por meio da técnica de RUGAI, MATTOS e BRIZOLA. Essas 367 amostras foram então colocadas em cultura de carvão vegetal ativado granulado e, após 5 a 7 dias, por meio da técnica de RUGAI, MATTOS e BRIZOLA, extraíram-se as larvas filarióides da cultura.

Em 266 amostras conseguiu-se extrair mais de 15 larvas filarióides que foram fixadas em TAF e mensuradas para cada parâmetro descrito anteriormente em triplicata, juntamente com as larvas rabditóides que já haviam sido anteriormente fixadas. Portanto, para a caracterização morfológica, 5505 larvas rabditóides e 3990 larvas filarióides foram mensuradas e, para cada um dos parâmetros avaliados fez-se a triplicata das medidas de cada larva para minimizar os erros oriundos da mensuração manual realizada no programa Motic Images Advanced 3.2

A caracterização morfológica das larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis* foi feita no microscópio óptico Leica Leitz DMRXE, que está acoplado a uma câmera filmadora Moticam 2000, onde é realizada a captura das imagens e as mensurações das larvas por meio do programa supracitado (Figuras 05 e 06).

A média e o desvio padrão foram calculados no programa Microsoft Office Excel 2003 o que tornou possível a construção da Tabela 07.

Tabela 07 – Média e Desvio Padrão das medidas (em μm) das larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis* obtidas de pacientes da região de Araraquara.

Parâmetros mensurados	Rabditóides	Filarióides
Comprimento Total (CT)	349,94 ± 39,62	506,02 ± 32,40
Comprimento do Esôfago (CE)	97,63 ± 9,05	214,29 ± 14,17
Comprimento da Cauda (CC)	59,46 ± 7,18	60,73 ± 5,75
Largura (L)	18,21 ± 1,66	14,75 ± 0,80
Comprimento do Primórdio Genital (CPr)	26,20 ± 3,74	-
Distância do Primórdio Genital à Cauda (DPC)	153,95 ± 24,19	-
Área do Primórdio Genital (APri)*	137,94 ± 28,15	-
Comprimento do Vestíbulo Bucal (CVB)	3,69 ± 0,65	-

*valores em μm^2

Por meio do teste de Spearman estabeleceram-se as correlações entre alguns parâmetros mensurados. À medida que as larvas rabditóides crescem, há um aumento significativo do comprimento do esôfago e da distância entre o primórdio genital e a cauda, e da mesma forma, ao passo que cresce o tamanho esôfago aumenta a distância entre o primórdio genital e a cauda, o que indica uma tendência a transformação da larva para a fase filarióide. Para as larvas filarióides somente observou-se correlação significativa, porém pequena, entre os comprimentos total e do esôfago das larvas, o que indica que quanto mais cresce a larva filarióide, ocorre um conseqüente crescimento do esôfago. Tais fatos podem ser visualizados nos gráficos de dispersão da Figura 13.

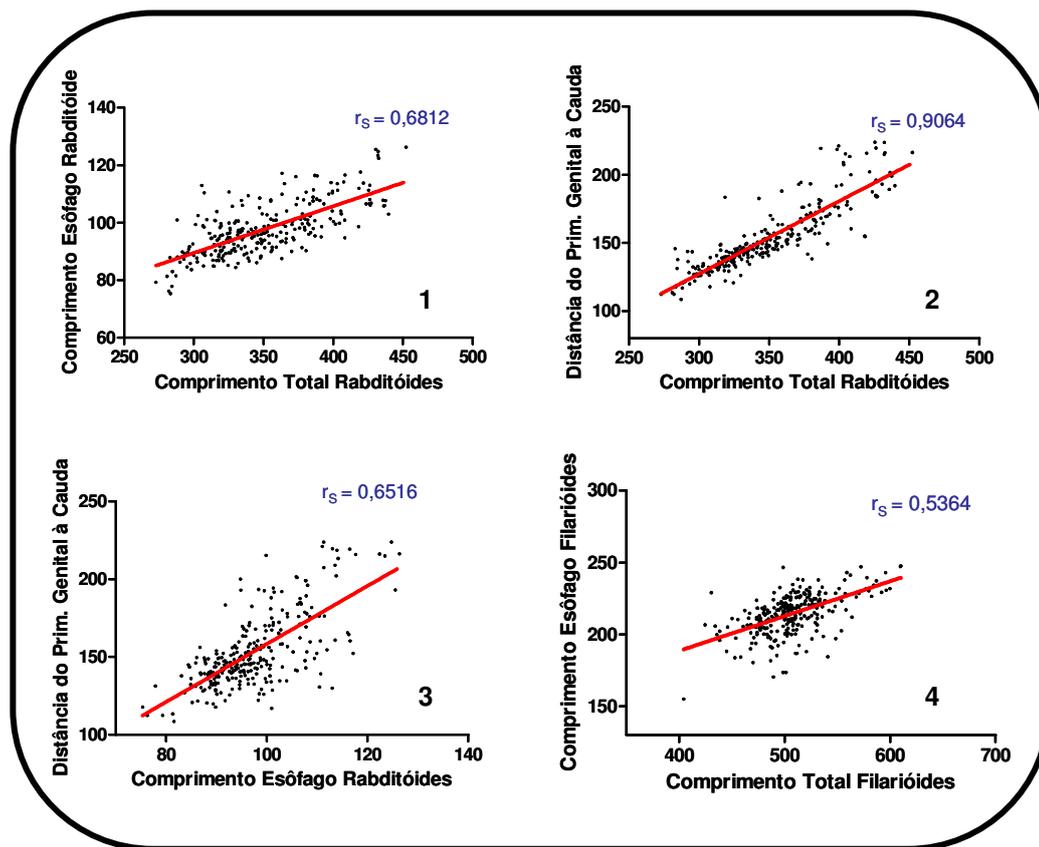


Figura 13 – Dispersão dos parâmetros morfométricos (1 – CTr X CER; 2 – CTr X DPC; 3 – CER X DPC; 4 – CTf X CEF).

As correlações entre os parâmetros morfométricos de larvas procedentes de indivíduos com e sem sintomas provenientes de municípios distintos (Araraquara, Américo Brasiliense, Rincão, Gavião Peixoto e Motuca) foram bastante semelhantes (Anexo 01), o que mostra que, isoladamente, o estudo morfométrico não é um bom parâmetro de identificação de larvas de *S. stercoralis*.

Por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível observar estruturas não visíveis quando do estudo morfológico em microscópio óptico (Figura 14 A, B e C):

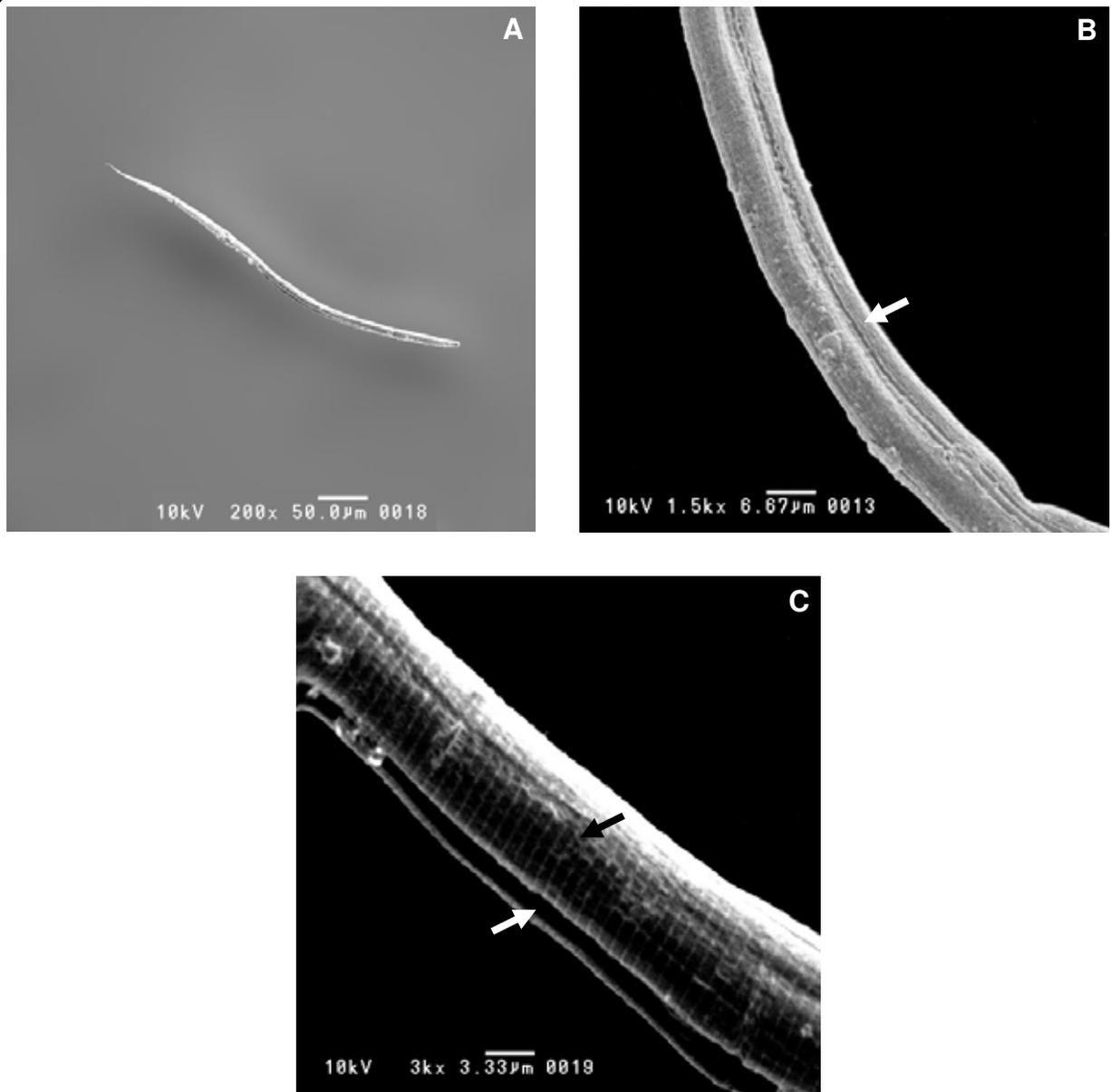


Figura 14 – Fotomicrografias de larvas filarióides de *S. stercoralis*. A – visão total (aumento de 200X); B – fenda no corpo da larva – seta branca (aumento de 1500 x); C – detalhes da fenda – seta branca – e estrias transversais – seta preta (aumento de 3000X).

Nota-se que a larva possui uma fenda longitudinal em toda extensão do corpo e que sua cutícula apresenta estrias transversais.

Para a caracterização molecular trabalhou-se com o Espaçador Interno Transcrito (ITS-1) do rDNA. O DNA genômico foi extraído de 400 a 1000 larvas filarióides recuperadas de coprocultura e que foram previamente conservadas em álcool 70% a -20°C (Figura 15).

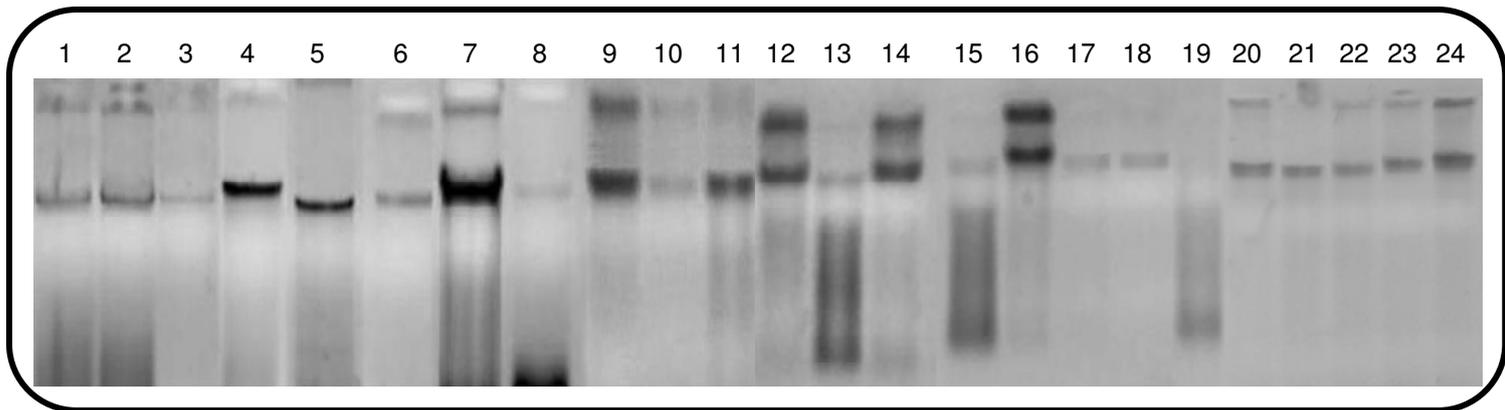


Figura 15 – Gel de agarose a 1% com produto de extração de DNA genômico corado com brometo de etídeo de 24 isolados de larvas filarióides de *S. stercoralis*.

O número de larvas filarióides em cada amostra variava entre 400 e 1000, por isso alguns isolados tinham maior concentração de DNA do que outros. As larvas ficaram estocadas em álcool 70% a -20°C e para alguns isolados percebemos degradação do DNA, porém essa degradação não impediu a realização das etapas subsequentes.

Após a extração do DNA realizou-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 750pb e logo em seguida, realizou-se uma segunda PCR (NESTED PCR) para obtenção de um fragmento de aproximadamente 680pb (Figuras 16).

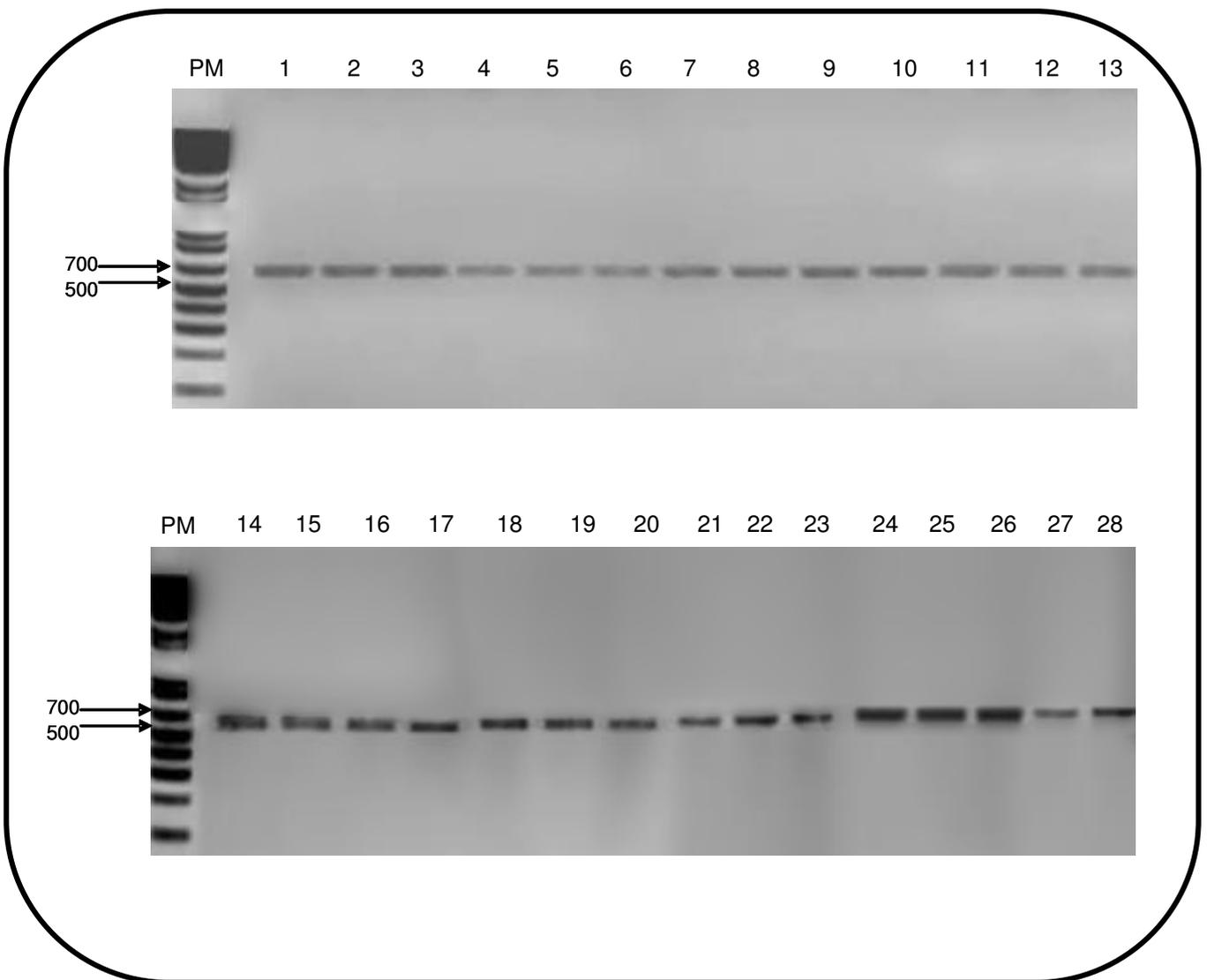


Figura 16 – Gel de agarose a 1,5% com produto de Amplificação do ITS-1 do rDNA corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 28 – isolados de larvas filarióides de *S. stercoralis*, com aproximadamente 680 pb.

Os produtos da NESTED PCR foram purificados e seqüenciados diretamente, gerando seqüências de ~ 370 pares de bases para os isolados de larvas filarióides de *S. stercoralis*, sendo possível verificar a existência de regiões polimórficas.

Nem todas as imagens das amostras estão aqui representadas devido a problemas ocorridos com o equipamento de captura de imagens.

Foram sequenciadas 43 amostras de larvas filarióides de *S. stercoralis* eliminadas por indivíduos provenientes dos municípios de Américo Brasiliense (14), Araraquara (22), Gavião Peixoto (3) e Rincão (4) e que se apresentaram sintomáticos (13) e assintomáticos (30).

As sequências obtidas para o ITS-1 do rDNA para a espécie *S. stercoralis* isoladas de pacientes infectados provenientes de municípios distintos, apresentaram máxima identidade > 80% e *E-value* tendendo ao zero, quando inseridas no programa Blastn e comparadas com outras sequência de *S. stercoralis* depositada no GenBank (EF5450041, por exemplo). Esses dados sugerem que as sequências devolvidas pelo GenBank têm alta probabilidade de estar relacionada com as sequências obtidas no presente trabalho.

Ao analisar as sequências da região ITS-1 de *S. stercoralis* separadamente, levando em consideração a presença e a ausência de sintomas, observaram-se perfis semelhantes (Figuras 17 e 18).

As sequências Ss3SAMB, Ss7SAMB, Ss13SAMB, Ss24SAMB, Ss28SAMB e Ss35SAMB (provenientes de larvas de pacientes sintomáticos habitantes de Américo Brasiliense) apresentaram poucas alterações de bases entre si, o que representa um baixo polimorfismo. O mesmo fato pôde ser observado nas sequências Ss16SAQA, Ss18SAQA, Ss20SAQA, Ss22SAQA, Ss30SAQA, Ss36SAQA, e Ss39SAQA (provenientes de larvas de pacientes sintomáticos habitantes de Araraquara).

O mesmo ocorreu para as sequências de larvas de pacientes assintomáticos: Ss1AAQA, Ss5AAQA, Ss11AAQA, Ss19AAQA, Ss21AAQA, Ss23AAQA, Ss25AAQA, Ss26AAQA, Ss27AAQA, Ss29AAQA, Ss31AAQA, Ss32AAQA, Ss33AAQA, Ss34AAQA e Ss40AAQA (provenientes de larvas de

pacientes assintomáticos habitantes de Araraquara) apresentaram baixo polimorfismo entre si, assim como as sequências Ss4AAMB, Ss8AAMB, Ss10AAMB, Ss14AAMB, Ss15AAMB, Ss17AAMB, Ss37AAMB e Ss38AAMB (provenientes de larvas de pacientes assintomáticos habitantes de Américo Brasiliense) com dois perfis, sendo um homogêneo ao perfil das amostras de Araraquara; Ss2ARIN, Ss6ARIN, Ss9ARIN e Ss12ARIN (provenientes de larvas de pacientes assintomáticos habitantes de Rincão) bastante homogêneas e Ss41AGAV, Ss42AGAV e Ss43AGAV (provenientes de larvas de pacientes assintomáticos habitantes de Gavião Peixoto).

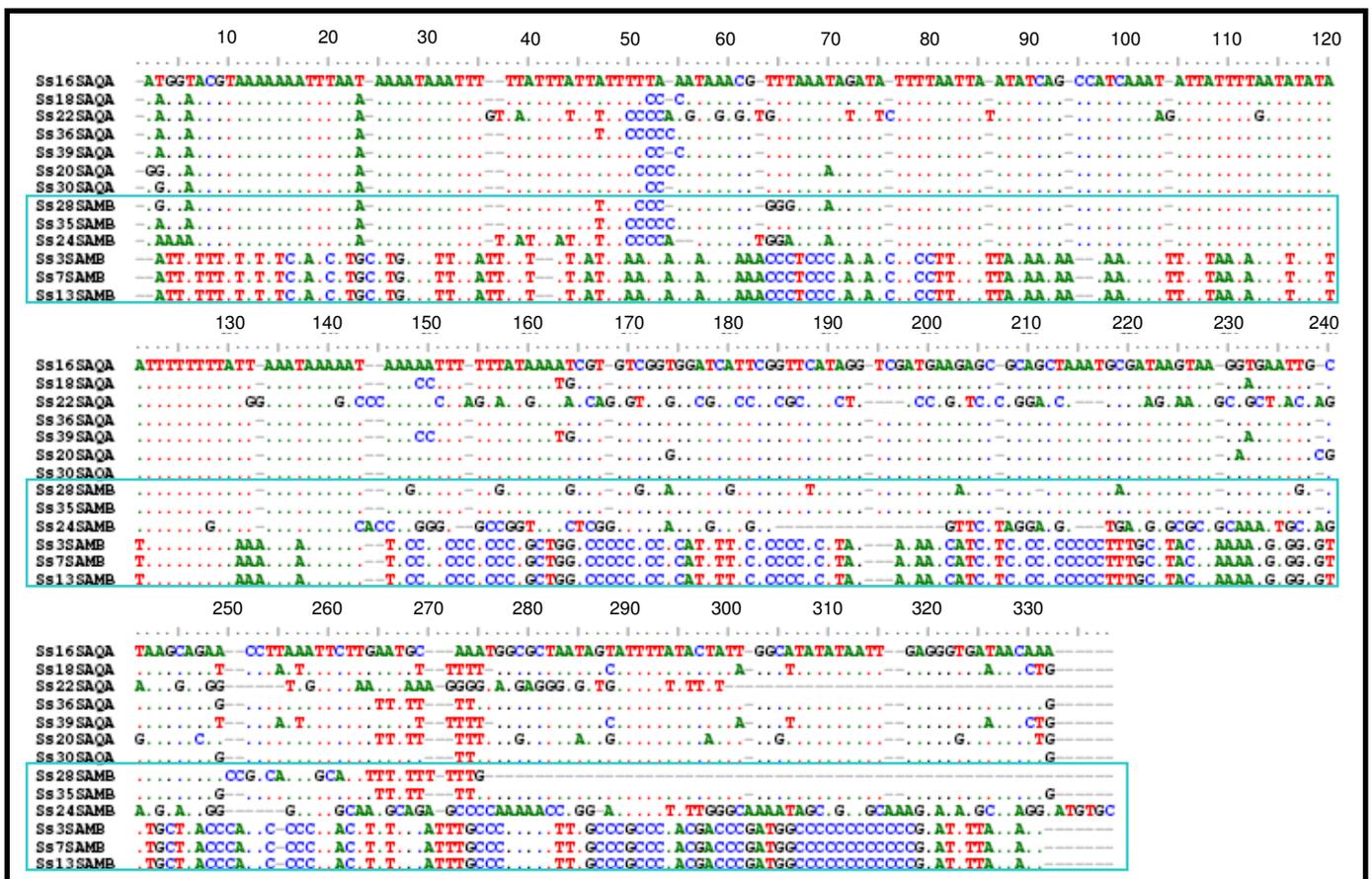


Figura 17 – Alinhamento de 13 sequências de larvas filarióides de *S. stercoralis* isoladas de pacientes sintomáticos provenientes de Américo Brasiliense e Araraquara.

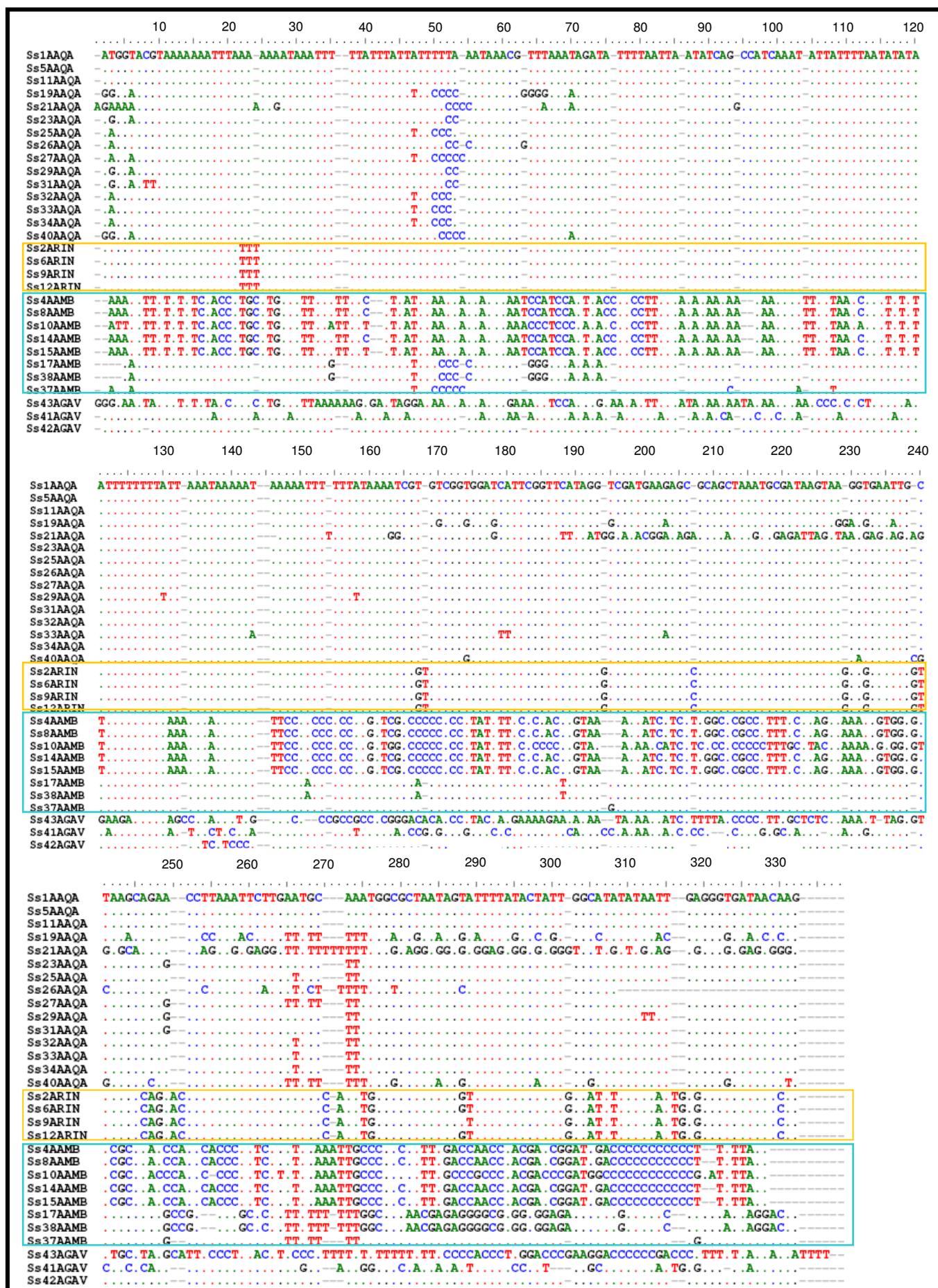


Figura 18 – Alinhamento de 30 seqüências de larvas filarióides de *S. stercoralis* isoladas de pacientes assintomáticos provenientes de Américo Brasileiro, Araraquara, Gavião Peixoto e Rincão.

Os diferentes perfis observados mostraram que ocorre alto polimorfismo entre sequências de larvas provenientes de indivíduos de municípios distintos, por exemplo, ao se comparar as sequências provenientes de Araraquara versus as provenientes de Américo Brasiliense.

V – DISCUSSÃO

A elevada prevalência das enteroparasitoses e a diversidade de manifestações clínicas, muitas vezes inespecíficas, representam um grave problema de Saúde Pública no Brasil, uma vez que aproximadamente um terço dos brasileiros vive em condições ambientais propícias à disseminação das doenças parasitárias (SALDIVA et al., 1999; PRADO et al., 2001; MUNIZ; QUEIROZ, 2002; FERREIRA et al., 2003).

Sabe-se também que as doenças parasitárias prevalecem nos países pobres, onde precárias condições de moradia, escassos recursos financeiros, falta de alimentação adequada, de estrutura no setor da saúde e familiar são extremamente comuns (PUPULIM et al., 1996; FERREIRA; MARÇAL, 1997; MIRANDA, et al., 1998; LUDWIG et al., 1999; FERREIRA et al., 2003).

Inquéritos coproparasitológicos são realizados nos dias atuais de forma isolada, por isso se observa resultados muito variáveis dos parasitas intestinais nas fezes de pessoas de diferentes regiões do mundo. A aplicação de diferentes métodos para a realização do exame parasitológico de fezes torna-se necessário, tendo em vista a variabilidade morfológica e biológica apresentada pelos parasitas (MINÉ, 2005).

Alguns trabalhos mostram uma menor incidência de enteroparasitos nas regiões onde o processo de desenvolvimento melhorou as condições de saneamento e abastecimento de água (ALVES et al., 1998; TAVARES-DIAS; GRANDINI, 1999; GRILLO et al., 2000; COULTER, 2002).

No artigo publicado em 2001, CHIEFFI, GRYSCHER e AMATO NETO relatam que “*Não obstante sua inegável importância como doença de massa, as*

parasitoses intestinais têm sido controladas em muitas regiões e países que conseguiram distribuir de forma socialmente justa os benefícios do desenvolvimento econômico e científico. Assim, determinados segmentos da população mundial conseguiram se beneficiar dos avanços alcançados pelo melhor conhecimento acerca da biologia, epidemiologia e prevenção de doenças causadas por agentes parasitários, bem como a síntese de drogas antiparasitárias mais eficazes e seguras, que ocorreram nas últimas décadas. Restam, todavia, consideráveis contingentes populacionais, concentrados principalmente nos países que constituem a periferia do mundo globalizado, mas também presentes em bolsões de pobreza que persistem nos países desenvolvidos, que continuam a pagar elevado tributo às infecções parasitárias, particularmente àquelas que se assestam no trato digestivo”.

Porém, na região de Araraquara, estudos realizados desde a década de 1970 mostram que num período de aproximadamente 40 anos quase nada mudou a cerca da frequência de enteroparasitos encontrados nas fezes de habitantes dessa região. No presente estudo observou-se que em 18,83% dos 19905 exames coproparasitológicos realizados, havia presença de algum parasito intestinal, sendo *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis*, *S. stercoralis*, Ancilostomídeos e *Trichuris trichiura* os parasitos mais frequentes (Tabela 01 e 02 e Figura 09). Tais resultados coadunam-se com aqueles observados por BUAINAIN e GIAZZI, 1970 (98,00%), BELDA NETO et al., 1976 (66,90%), GIAZZI et al, 1982 (80,00%), MENDONÇA et al., 1984 (21,00%), CAPUANO et al., 1995 (32,80%), MINÉ et al, 2004 (28,10%) e por MINÉ e ROSA, 2008 (34,60%) cujos trabalhos foram realizados com diferentes grupos de habitantes da região do município de Araraquara – SP.

Diante do exposto, pode-se depreender que a despeito da melhora do sistema de coleta e tratamento de água e esgoto no município de Araraquara (cidade com maior número de pessoas examinadas), que atende praticamente 100% dos domicílios (CAMPOS, et al, 2002) ainda encontramos considerável ocorrência de enteroparasitos na região. Mesmo que nos últimos 30 anos tenha ocorrido queda da prevalência de enteroparasitoses no Brasil, é preciso investimentos nas áreas de saneamento básico, saúde e educação para que, mesmo as regiões com elevados índices de desenvolvimento (como é o caso da região do município de Araraquara) diminuam seus índices de habitantes com doenças parasitárias.

Associado a isso, as gestantes que representam um grupo de indivíduos com características próprias e transitórias dos padrões metabólicos, endocrinológicos e imunológicos (MACEDO; REY, 1996) precisam de cuidados especiais quando portadoras de doenças parasitárias. No presente estudo, 5300 mulheres em período gestacional realizaram exames parasitológicos de fezes e 21,98% albergava algum enteropasita. Dos parasitos patogênicos encontrados, *Giardia duodenalis*, *S. stercoralis* e Ancilostomídeos foram os mais frequentes. Interferências das parasitoses no curso da gravidez são relatadas por alguns autores que dizem serem prováveis as repercussões ao feto ou ao recém-nascido (prematividade, retardamento do desenvolvimento intra-uterino e perda de peso), porém há muita dúvida sobre quais são os reais riscos à gestação e como realizar o tratamento da gestante parasitada (CINTRON-VILLARONGA, 1967; MAC LEOD, 1988; VILLAR et al., 1989).

COX em 1993 relata que *Entamoeba coli* é a ameba mais comum em fezes humanas. Nesse estudo nota-se que esse protozoário, juntamente com

outros não patogênicos, são bastante frequentes nas fezes dos voluntários da pesquisa (55,32% em relação aos exames positivos). Esses protozoários apresentam mecanismos de transmissão semelhantes aos de outros sabidamente patogênicos (*Giardia duodenalis*, por exemplo). Tal fato serve como indicador das condições sócio-sanitárias, da contaminação fecal da água e alimentos e dos precários hábitos de higiene que uma parcela dos indivíduos está exposta (ROCHA et al., 2000; SATURNINO et al., 2003; MACEDO, 2005; SATURNINO et al., 2005; TASHIMA et al., 2005).

Quanto aos helmintos, cabe ressaltar que devido ao fato de não se ter realizado técnicas diagnósticas específicas para o encontro de *Enterobius vermicularis* e *Taenia* sp., os resultados desse estudo para esses parasitos podem estar subestimados, da mesma forma que GIAZZI et al, 1974 relataram, uma vez que as técnicas de Graham e de tamização das fezes não foram feitas. Os geohelmintos ocorrem com frequência considerável na região estudada, sendo encontrados em 1376 (36,70%) dos exames de fezes realizados com resultado positivo. Tal observação permite perceber que as doenças parasitárias ocasionadas por esses helmintos, que normalmente levam o indivíduo a um déficit orgânico importante e que são relatadas como típicas das regiões mais pobres do país (RIBEIRO; MARÇAL JÚNIOR, 2003), ocorrem também em regiões, como a aqui estudada, em que o clima, os fluxos migratórios e as condições econômicas e sociais aumentam os riscos de contaminação.

No presente estudo observamos que a quantidade de indivíduos monoparasitados é bastante superior à de poliparasitados (Figura 10) e que o número de pessoas que apresentaram fezes diarréicas foi menor do que das

peças com fezes pastosas e formadas (Figura 11). Isso pode ser explicado pelo fato de que a grande maioria das pessoas com fezes pastosas e formadas não apresentaram parasitos em suas fezes ou albergavam algum parasito não patogênico. Já, dentre os 3749 voluntários que apresentaram algum enteroparasito nas fezes, 277 apresentaram fezes diarréicas com predomínio de infecção por *Giardia duodenalis* e *S. stercoralis* ou associação desses parasitos com algum não patogênico.

No laboratório de Parasitologia Clínica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara se realiza corriqueiramente três metodologias para o exame coproparasitológico: Exame Direto, Coprotest e Rugai. Os dois primeiros métodos não devem ser considerados como de escolha para o diagnóstico da estrogiloidíase, uma vez que o encontro de larvas por esses métodos será decorrente de uma alta carga parasitária (ALVARENGA; FERRAZ, 2004). Já, a técnica de RUGAI, MATTOS E BRISOLA, 1954 é específica para o encontro de larvas de nematódeos nas fezes, pois leva em consideração as características do termo e hidrotropismo das larvas de Ancilostomídeos e *S. stercoralis*.

Assim, no presente estudo das 19905 amostras de fezes examinadas, 3789 apresentaram-se positivas para a presença de um ou mais parasitos. Dessas, 869 (4,37%) foram provenientes de indivíduos que albergavam o nematódeo *S. stercoralis*.

De acordo com DAVIDSON et al., 1984, os homens têm maiores riscos de adquirir estrogiloidose do que as mulheres. A administração de andrógenos a fêmeas de camundongos mostrou que ocorre maior infecção por *S. ratti* em fêmeas, portanto, fatores hormonais podem estar atrelados ao

aumento da susceptibilidade dos machos à infecção (KIYOTA et al., 1984). SATOH et al., 2004, mostrou que a infecção pelo *S. stercoralis* ocorre com maior frequência em indivíduos do sexo masculino devido a resistência ao tratamento ocasionada por concentrações elevadas de IgG4 contra *S. stercoralis*. Neste estudo, do total de indivíduos parasitados pelo *S. stercoralis*, 503 eram do sexo masculino e 399 do sexo feminino, resultado semelhante foi encontrado por TEIXEIRA, 1997 em Campinas – SP e por ROMÁN-SÁNCHEZ et al., 2001 na costa espanhola do Mediterrâneo.

Ao se comparar as variáveis sexo e idade dos portadores de *S. stercoralis* no presente trabalho nota-se que há significativamente mais homens maiores de 40 anos infectados e mais mulheres menores de 40 anos infectadas (Tabela 03). Isso pode ser devido, no caso do sexo masculino, a um maior contato com o solo, pelo fato de grande parte desses indivíduos trabalharem em regiões rurais dos municípios de onde são oriundos (BAPTISTA et al., 2006) e no caso do sexo feminino, pode ser que o número de gestantes possa ter influenciado a maior frequência nas mulheres abaixo de 40 anos, por uma provável debilitação do sistema imune durante o período gestacional. Estudos realizados em 1982 por WALZER et al. e por ARAKAKI em 1992 apontam que a estrogiloidíase ocorre com maior frequência em indivíduos maiores de 30 anos. Outra explicação para o fato desse nematódeo afetar mais comumente indivíduos adultos é o caráter assintomático e crônico da estrogiloidíase, além da possibilidade da ocorrência da auto-infecção interna e externa do parasito, fazendo com que indivíduos permaneçam anos parasitados (GROVE, 1980).

De acordo com a procedência dos indivíduos participantes da pesquisa portadores de *S. stercoralis*, observou-se que havia diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos infectados procedentes do município de Araraquara e os infectados pelo *S. stercoralis* provenientes de outras cidades da região estudada (Tabela 04). Isso pode ter ocorrido devido à facilidade de locomoção até o laboratório dos indivíduos de Araraquara e ao fato das amostras de fezes dos outros municípios serem trazidas esporadicamente (MINÉ, 2005).

EL-DIB, 2004, KEISER, 2004 e MAGUIRE, 2005, relatam que mais de 50% dos portadores de estrogiloidíase são assintomáticos, enquanto que os sintomáticos apresentarão sintomas inespecíficos como diarreia, náusea e desconfortos intestinais. Do total de indivíduos parasitados observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre aqueles que se apresentaram assintomáticos com ou sem estrogiloidose e aqueles que se queixavam de algum sintoma (Tabela 5). Dor abdominal, diarreia e tosse foram os sintomas mais relatados pelos voluntários dessa pesquisa. Os resultados aqui apresentados assemelham-se com os de ROMÁN-SÁNCHEZ et al., 2001, que durante os anos de 1990 e 1997 examinaram 16607 amostras de fezes na Espanha e encontraram 152 (0,9%) amostras positivas para *S. stercoralis*, cujos pacientes apresentavam-se em sua maioria assintomáticos e dentre os sintomáticos, diarreia, dor abdominal e tosse foram os sintomas mais relatados.

Segundo PIERANGELI et al., 2003, a presença de protozoários e helmintos potencialmente patogênicos ao homem no solo está associada a características do solo, presença de cobertura vegetal e condições climáticas.

As variações sazonais de clima e umidade podem influenciar a distribuição e sobrevivência de ovos, larvas, cistos e oocistos no solo (NZEAKO, 1992; SCHULZ; KROEGER, 1992; SMITH, 1998; MERCADO et al., 2004).

S. stercoralis apresenta ampla distribuição geográfica, predominando em regiões quentes e úmidas que são também características ambientais favoráveis a sobrevivência de Ancilostomídeos. A região do município de Araraquara possui clima tropical de altitude, caracterizado por duas estações bem definidas: verão com temperaturas altas e pluviosidade elevada e inverno de temperaturas amenas e pluviosidade reduzida (CAMPOS, et al, 2002). Segundo CHAIA, 1963, a prevalência de *S. stercoralis* em regiões de clima tropical de altitude fica entre 2,5 e 37,7%.

No presente estudo foram analisadas as médias diárias de temperatura e de precipitação e correlacionou-se esses dados com a positividade de *S. stercoralis* nos exames realizados.

A simples observação da frequência desse parasito nos exames de fezes realizados mostrou que durante os 49 meses estudados obteve-se frequências superiores a 1,5% (Figuras 12A e 12B), denotando a região de Araraquara como endêmica para estrogiloidíase, e que, em 15 meses as frequências observadas para esse parasito foram superiores a 5,0%, o que é característica de regiões hiperendêmicas (PIRES; DREYER, 1993).

Apesar das correlações entre a frequências de aparecimento de *S. stercoralis* com o número de dias chuvosos no mesmo mês (0,017) e no mês anterior (0,126) serem baixas, podemos notar que ocorre maior relação entre a positividade de *S. stercoralis* nas fezes e a quantidade de dias chuvosos no mês anterior. Tal observação isolada é pouco informativa, porém se a associarmos

com o tipo de clima da região e com o ciclo de vida do parasito, podemos entender a ocorrência de larvas filarióides de *S. stercoralis* no solo, o que favorece a sua transmissão e a presença das larvas rabditóides nas fezes dos indivíduos parasitados no mês seguinte (período pré-patente: 15 a 25 dias) (GROVE, 1996).

Durante todos os meses avaliados tem-se considerável frequência de indivíduos com estrogiloidíase (Tabela 06), porém nos meses cujas médias de temperatura foram mais baixas (inverno) observamos um número menor de indivíduos parasitados quando comparamos com as outras épocas do ano. Num estudo conduzido em Maringá – PR os resultados foram contrários à expectativa dos autores que observaram uma maior frequência de parasitos no solo durante o inverno, porém, larvas de *Strongyloides* sp. somente foram encontradas no verão (TIYO et al., 2008).

No presente trabalho as larvas rabditóides de *S. stercoralis* foram recuperadas das fezes dos voluntários da pesquisa por meio da técnica de RUGAI, MATTOS E BRIZOLA, 1954. Das 869 amostras positivas para esse nematódeo, em 367 encontrou-se mais de 15 larvas rabditóides quando do diagnóstico coproparasitológico. Essas amostras foram então submetidas à cultura em carvão vegetal ativado granulado e em 266 amostras conseguiu-se extrair mais de 15 larvas filarióides que foram fixadas e estudadas morfometricamente.

Segundo SANDGROUND, 1925; LITTLE, 1966 e SPEARE, 1989 o tamanho das larvas reflete um estágio de crescimento e metamorfose, porém está sujeito a variações, uma vez que sofrem influências do meio no seu

desenvolvimento e por isso raramente são usadas para identificação de espécies.

Contudo, pela primeira vez, a caracterização morfométrica de larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis* foi realizada em microscópio óptico Leica Leitz DMRXE, que está acoplado a uma câmera filmadora Moticam 2000, onde é realizada a captura das imagens e as mensurações das larvas por meio do programa Motic Images Advanced 3.2 (Figuras 05 e 06). Em trabalhos anteriores as mensurações das larvas eram feitas por meio de desenhos em câmara clara e aí se procedia à mensuração com curvímeter (TEIXEIRA, 1997). Em 2006, VIEIRA, LIMA E BESSA procederam a análise morfométrica de *Strongyloides* sp. isolados de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) com auxílio de ocular micrométrica.

As medidas dos parâmetros avaliados neste trabalho foram compatíveis com as descritas na literatura. LITTLE, 1966 admite que para as larvas rabditóides do gênero *Strongyloides*, o comprimento total varia entre 150 μm e 390 μm e a largura entre 14 μm e 20 μm . GALLIARD, 1967 define em seu estudo que o comprimento dessas larvas varia entre 280 μm e 310 μm e a largura varia de 15 μm a 18 μm . SPEARE, 1989, admite 400 μm para o comprimento total das larvas rabditóides desse gênero por 23 μm de largura e TEIXEIRA, 1997, obteve 385 μm como medida média para comprimento total das larvas rabditóides de *S. stercoralis* por 21,1 μm de largura.

Neste estudo, as larvas rabditóides apresentaram comprimento total médio de 349,49 μm , variando de 309,67 μm a 389,11 μm por 18,21 μm de largura, que variou de 16,55 μm a 19,87 μm . Já a média do comprimento da cauda das larvas rabditóides de *S. stercoralis* foi de 59,46 μm variando de

52,28 μm a 66,64 μm sendo compatível com os valores encontrados por LITTLE, 1966, SPEARE, 1989 e TEIXEIRA, 1997: 40 μm a 60 μm .

LITTLE, 1966 admite que para o comprimento do esôfago das larvas rabditóides há variação entre 80 μm e 94 μm . No estudo desenvolvido por TEIXEIRA, 1997, a variação para esse parâmetro foi de 80 μm a 130 μm com média de 97,7 μm . No presente trabalho a média para o comprimento do esôfago foi de 97,63 μm , variando de 88,58 μm e 106,68 μm ocupando 28% do tamanho total da larva rabditóide. Correlações semelhantes entre o comprimento total das larvas rabditóides e o comprimento do esôfago (0,68), e, entre o comprimento do esôfago e a distância do primórdio genital à cauda (0,65) foram observadas e mostraram que as larvas crescem e o esôfago também, porém não na mesma proporção e que, ao crescer o tamanho do esôfago, cresce também a distância do primórdio genital à cauda, mas também, não na mesma proporção (Figuras 04.1 e 04.3).

Para a distância do primórdio genital à cauda das larvas rabditóides, obteve-se média de 153,95 μm variando de 129,76 μm a 178,14 μm . Tal medida foi inferior àquela observada no estudo conduzido por TEIXEIRA, 1997 (194,36 \pm 27,40) e indica que quanto menor o comprimento total da larva rabditóide menor será a distância do primórdio genital à cauda (Figura 04. 2).

O comprimento médio do primórdio genital foi de 26,20 μm com variações entre 22,46 μm e 29,94 μm no presente estudo, bastante semelhante à média desse parâmetro encontrada por TEIXEIRA, 1997, que foi de 27 μm , porém, as variações obtidas foram bem inferiores a do trabalho citado (13 μm a 54 μm), o que indica que possivelmente teve-se um número de larvas de primeiro estágio superior a de segundo estágio, uma vez que do primeiro para o

segundo estágio ocorre crescimento do primórdio genital que, por sua vez, tende a diminuir com a muda para o estágio infectante.

Avaliaram-se também as medidas da área do primórdio genital e o comprimento do vestíbulo bucal das larvas rabditóides, parâmetros esses que não foram reportados nos trabalhos citados. As correlações entre o comprimento do vestíbulo bucal e os parâmetros já reportados indicam que à medida que crescem os comprimentos da larva, do esôfago e da cauda, diminui o comprimento do vestíbulo bucal indicando a transformação das larvas rabditóides em filarióides, cujo vestíbulo bucal é inconspícuo. Das correlações que envolveram a área do primórdio genital, a única que apresentou, obviamente, significância estatística foi com o comprimento do primórdio genital ($r_s = 0,54$).

Medidas acima ou abaixo da média encontrada indicam a possibilidade das larvas estarem sofrendo metamorfose ou que apresentam desenvolvimento retardado, respectivamente (TEIXEIRA, 1997).

Quanto às larvas filarióides, o estudo morfométrico realizado foi coerente com os dados observados por LITTLE, 1966, SPEARE, 1989 e TEIXEIRA, 1997. O comprimento total das larvas filarióides gira em torno de 400 μm a 700 μm por 12 μm a 20 μm de largura, e o esôfago ocupa de 40 a 45% do total do corpo da larva, segundo LITTLE, 1966, e SPEARE, 1989. O trabalho de TEIXEIRA, 1997 corrobora esses achados com média de 505,53 μm para o comprimento total da larva filarióide por 15,52 μm de largura e esôfago ocupando 43% do total do corpo da larva. No presente estudo obtiveram-se médias bastante semelhantes à desses trabalhos com média de comprimento total de 506,02 μm variando de 473,62 μm a 538,42 μm , por 14,75 μm de

largura que variou de 13,95 μm a 15,55 μm e o esôfago ocupou 42,3% do tamanho total da larva filarióide. Nota-se que quanto maior o comprimento da larva filarióide maior será o comprimento do esôfago, porém, o esôfago não cresce na mesma proporção (Figura 05).

O comprimento da cauda das larvas filarióides observado neste trabalho variou de 54,98 μm a 66,48 μm com média de 60,73 μm , semelhante à obtida por SPEARE, 1989 e TEIXEIRA, 1997. Quanto ao comprimento da cauda das larvas filarióides as medidas são próximas às das larvas rabditóides o que denota que há pequeno crescimento da cauda na fase filarióide e que o crescimento da larva se faz principalmente pela região anterior e mediana (TEIXEIRA, 1997).

As variações observadas nos trabalhos citados podem ser devidas a diferentes metodologias utilizadas para mensuração das larvas, à fonte das cepas de *S. stercoralis* utilizadas e ao número de amostras utilizadas. SANDGROUND, 1925, provou em seus experimentos que há diferenças entre cepas de origem zoonótica e de origem humana. No presente trabalho, assim como no de TEIXEIRA, 1997, todas as larvas mensuradas foram provenientes de fezes e de cultura de fezes humanas e o número de larvas medidas foi superior aos dos trabalhos aqui citados.

O estudo da morfologia por meio de MEV tornou evidente características não observadas pela microscopia óptica, que foram as estrias transversais na cutícula do corpo das larvas filarióides de *S. stercoralis*, já reportadas por MORAES em 1948 e por GROVE em 1996. Contudo esses autores não mencionam a existência de fenda longitudinal na extensão do corpo da larva observada neste estudo (Figura 14.A, 14.B e 14.C).

Na tentativa de se caracterizar diferentes cepas de *S. stercoralis* na região estudada, correlacionaram-se os parâmetros morfométricos anteriormente discutidos, separando as amostras por municípios de origem dos seus portadores e também pela presença ou ausência de sintomas, porém, não se obteve correlações significativas uma vez que para grupo estudado, as correlações foram extremamente semelhantes (Anexo). Tal resultado vai ao encontro à conclusão feita por TEIXEIRA, 1997, de que a análise morfométrica isoladamente não permite identificar cepas de *S. stercoralis*.

Sendo assim, procedeu-se o sequenciamento da região ITS-1 do rDNA das larvas filarióides de *S. stercoralis* na tentativa de caracterizar diferentes cepas desse parasito, uma vez que essa região é altamente polimórfica.

As sequências geradas foram alinhadas e analisadas considerando a presença ou ausência de sintomas e a procedência dos pacientes. Procedeu-se a análise das sequências dos indivíduos com exame positivo para *S. stercoralis* e que referiam sintomas juntamente com aquelas dos indivíduos portadores assintomáticos desse parasito (Figuras 17 e 18). Quando se comparou as sequências obtidas de larvas de indivíduos classificando-os pelos seus municípios de origem, nota-se um baixo polimorfismo tanto nos sintomáticos quanto nos assintomáticos. Portanto, pela análise das sequências do ITS-1, não se conseguiu caracterizar os parasitos pelo fato do paciente apresentar ou não sintomas, fato esse bastante vinculado à características imunológicas do hospedeiro, ao grau de parasitismo e à fase da infecção (GROVE, 1996).

Com o sequenciamento da região ITS-1 do rDNA de larvas filarióides de *S. stercoralis* foi possível caracterizar cepas diferentes desse nematódeo. Independentemente da presença ou ausência de sintomas no portador, quando

analisadas as sequências de larvas de indivíduos de procedências distintas, essas se mostraram polimórficas.

Esse resultado difere do reportado por RAMACHANDRAN et al., 1997, que realizaram estudos com RFLP e conseguiram diferenciar cepas de *S. stercoralis* isoladas de cães e de humanos utilizando quatro enzimas de restrição. Os isolados humanos utilizados foram provenientes de um imigrante do sudeste asiático e as larvas foram inoculadas em macacos da espécie *Erythrocebus patas*; de um paciente de Virgínia – EUA; de um paciente com co-infecção pelo vírus linfotrópico de células T oriundo da Ilhas Britânicas do Oeste e de um paciente brasileiro.

De acordo a técnica utilizada para caracterização de variabilidade entre as cepas, esses autores, afirmaram que não há variação entre *S. stercoralis* isolados de humanos de diferentes áreas geográficas. Talvez pelo fato de terem sido utilizados poucos isolados (quatro), não tenham notado variação na restrição das enzimas. Já o sequenciamento de genes é uma técnica mais precisa, na qual se podem realizar comparações base a base de um fragmento específico.

Outros estudos têm sido conduzidos com o sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais de espécies do gênero *Strongyloides* com finalidades taxonômicas, diagnósticas e evolutivas. (HU; CHILTON; GASSER, 2003; NILFOROUSHAN et al., 2007; KIA et al., 2008; VERWEIJ et al., 2009; SANTOS, et al., 2009)

Este estudo mostra que a região ITS-1 do rDNA pode ser utilizada como marcador para caracterizar cepas de diferentes isolados humanos de *S. stercoralis*, uma vez que se mostrou suficientemente polimórfica. Sugere-se

ainda, estudos com outras espécies do gênero *Strongyloides* utilizando esse e outros marcadores a fim de caracterizar as diferentes cepas.

VI – CONCLUSÕES

- Foi possível caracterizar cepas de *S. stercoralis* isoladas de pacientes residentes em municípios distintos por meio de sequenciamento do ITS-1 do rDNA de larvas filarióides;
- O estudo morfométrico das larvas rabditóides e filarióides corrobora as mensurações já descritas na literatura para a espécie *S. stercoralis* e acrescenta dados de medidas do comprimento do vestíbulo bucal e da área do primórdio genital das larvas rabditóides;
- O estudo morfométrico das larvas rabditóides e filarióides não se mostrou eficiente como parâmetro para identificação de cepas de *S. stercoralis*;
- Na literatura consultada não foi encontrada referência à fenda longitudinal observada por MEV no corpo de larvas filarióides de *S. stercoralis*;
- A região de Araraquara enquadra-se como região endêmica para a strongiloidíase. Medidas que visam à profilaxia dessa doença parasitária devem ser adotadas na região estudada;

- *Strongyloides stercoralis* foi encontrado em 869 (4,37%) das 19905 amostras examinadas, por meio dos métodos de exame direto a fresco, Coprotest e de Rugai, Mattos e Brisola;
- Para diagnóstico laboratorial de *S. stercoralis* é imprescindível a utilização de métodos específicos que propiciem a visualização de larvas;
- A estrongiloidíase assintomática é mais frequente que a sintomática, fato este que propicia a disseminação de larvas no solo e, conseqüentemente, aumenta a possibilidade de novos casos;
- Os homens > 40 anos são mais frequentemente parasitados pelo *S. stercoralis* do que as mulheres, porém as mulheres apresentam maior frequência de infecção quando < de 40 anos;
- Das 19905 amostras de fezes examinadas, 18,8% apresentaram-se positivas para um ou mais enteroparasitas, sendo os protozoários e helmintos mais frequentes: *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis* e *S. stercoralis* e Ancilostomídeos, respectivamente;
- Das 13102 amostras de indivíduos do sexo feminino, 5300 eram de gestantes, sendo que 22,0% delas apresentaram-se parasitadas e *S. stercoralis* foi o helminto mais frequente (14,5%);

- Por ser altamente polimórfica, sugere-se que a região ITS-1 do rDNA possa ser utilizada para caracterização de cepas de *S. stercoralis*. Propõem-se ainda estudos com outras espécies do gênero *Strongyloides* utilizando esse e outros marcadores a fim de caracterização específica e de cepas.

VII – REFERÊNCIAS

- ALCAÍNO, H.; TAGLE, I. Estudio de enteroparasitosis en el perro en Santiago. **Bol Chil Parasitol**, v. 25, p. 5-8, 1970.
- ALMEIDA L. P.; COSTA-CRUZ J. M. Incidência de enteroparasitas em habitantes do município de Araguari, Minas Gerais. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v. 4, n. 1, p. 9-17, 1988.
- ALVARENGA, V.L.S.; FERRAZ, P.F. Avaliação da eficiência dos métodos Direto, Cprotest e Rugai no diagnóstico da estrogiloidíase. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 25, p.53-7, 2004.
- ALVES, M.S.; VILELA M.A.P.; BARBOSA N.R. et al. Parasitosis incidence in children from EME, “Sant’Ana Itatiaia”, Juiz de Fora – MG, Brazil and possible relationship with the presence of the parasites in source of water. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 30, n.4, p.85-87, 1998.
- AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; PINTO, P. L. S.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A.; MIYAMOTO, A.; FOSTER, R.; NASCIMENTO, S. A. B.; SOUZA, H. B. W. T.; MOREIRA, A. A. B. Evaluation of the use fulness of Coprotest for stool parasitological examination. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo**, v.44, n. 4, p. 153-5, 1989.
- ARAKAKI, T.; MASSAAKI, I.; RYUJI, A.; TSUYOSHI, I. Age-related prevalence of Strongyloides stercoralis infection in Okinawa, Japan. **Trop. Geogr, Med.**, v. 44, n. 14, p. 299-303, 1992.
- ARCHIBALD L. K.; BEECHING, N. J.; GILL, G. V. Albendazole is effective treatment for chronic strongyloidiasis. **Q J Med**, v. 86, p. 191-5, 1993.

- ASHFORD, R. W.; BARNISH, G.; VINEY, M. E. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: Infection and Disease in Papua New Guinea **Parasitology Today**, v. 8, p. 314 – 8, 1992.
- ASHFORD, R. W.; CREWE, W. The parasites of *Homo sapiens*. **Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom**, 1998.
- BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. **Mededeel mit. H. Geneesk.** Batavia: Lab. Weltevreden. Feestbundel, p.41-47, 1917.
- BAPTISTA, S.C.; BREGUEZ, J.M.M.; BAPTISTA, M.C.P.; SILVA, G.M.S.; PINHEIRO, R.O. Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ. **RBAC**, v. 38, n. 4, p. 271-3, 2006.
- BARANSKI, M.C.; SILVA, A.F.; KOTAKA, P.I.; GOMES, N.R.; GIOVANONNI, M.; TELLES, J.E.Q. Tratamento da estrogiloidíase humana com novo anti-helmíntico, o cambendazole. Estudo duplo cego. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 20, p. 218-28, 1978.
- BAVAY, A. Sur l'anguillule intestinale (*Languillula intestinalis*), nouveau ver n'matoide trouvé par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de cochinchine. **Comp. Rend. Sci. Biol.**, v. 84, p. 266-68, 1876.
- BELDA NETO, F. M.; TRONCON, C. A. A.; BELLENZANI, J. R. L.; LAUAND, A. T. Prevalência de Enteroparasitas em Crianças da Cidade de Américo Brasiliense, Estado de São Paulo. **Rev. Fac. Farm. Odont.**, v. 10, suppl. 2, p. 275-9, 1976.
- BERK, S. L.; VERGHHESE, S.; ALVAREZ, K.; HALL, K.; SMITH, B. Clinical and epidemiologic features of strongyloidiasis. A prospective study in rural Tennessee. **Arch Intern Med**, v. 147, p. 1257-61, 1987.

- BRINDLEY, P. J.; GAM, A. A.; PEARCE, E. J.; POINDEXTER, R. W.; NEVA, F. A. Antigens from the surface and excretion/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 28, p. 171-80, 1988.
- BUAINAIN, A.; GIAZZI, J. F. Determinação da Incidência de Enteroparasitas em Internados no Educandário “Domingos Sávio” de Araraquara. **Rev. Farm. Odont.**, v. 36, p. 263-6, 1970.
- CAMPOS, D. M. B.; FERREIRA, M. S. Estrongiloidíase. In. CIMERMAN, B.; CIMERMAN S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 Ed. São Paulo: Atheneu, p.293-303, 2005.
- CAMPOS, J.A.D.B.; FARACHE FILHO, A.; FARIA, J.B. Qualidade Sanitária da Água Distribuída para Consumo Humano pelo Sistema de Abastecimento Público da Cidade de Araraquara – SP. **Alim. Nutr.**, v. 13, p. 117-29, 2002.
- CAPUANO, D.M.; OKINO, M.T.; BETTINI, M.J.C.B.; LIMA, L.R.O. Prevalência de enteroparasitoses sua correlação com o nível sócio-econômico e hábitos de higiene entre escolares do município de Araraquara, SP, Brasil. In: **VII Congresso Paulista de Saúde Pública, 2003, Ribeirão Preto – SP**. Anais.
- CELEDON, J.C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J. Sistemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 73, p. 256-63, 1994.
- CHAIA, G. Atividade do 2(4'-tiazolil)-benzimidazol Tiabendazol em ratos experimentalmente infestados pelo *Strongyloides ratti*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 3, p. 154-9, 1963.

- CHIEFFI, P. P.; WALDMAN, E. A.; DIAS, R. M. D. S.; TORRES, D. M. A. G. V.; CHIMARA, R.; MIZUMOTO, L. C.; SILVA, A. M. A.; UEHARA, M. Enteroparasitoses no município de Guarulhos, SP, Brasil. Prevalência de infecções em escolares residentes no bairro de Taboão, em junho de 1984. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 48, n. ½, p. 75-80, 1988.
- CHIEFFI, P.P.; GRYSCHER, R.C.B.; AMATO NETO, V. **Parasitoses Intestinais: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Lemos Editorial, 2001.
- CINTRON-VILLARONGA, J. R. *Ascaris* and *Uncinaria* in pregnancy. **Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico**, v. 59, p.468-471, 1967.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003.
- CONCHA, R.; HARRINGTON JR, W.; ROGERS, A. I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 203-211, 2005.
- CORREA, L. L.; SILVA, M. I. P. G.; SILVA, R. M.; DIAS, D. M. D. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*: diagnóstico diferencial das larvas infectantes e prevalência em amostras fecais provenientes da Grande São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 39, p. 145-53, 1979.
- COSTA, H.M.A. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- COSTA-CRUZ J.M. *Strongyloides stercoralis*. In. NEVES D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed., São Paulo: Atheneu, p. 247-256, 2005.

- COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected in filter paper, in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329-32, 1998.
- COULTER, J.B.S. Global importance of parasitic disease. **Current Paediatrics**, v12, n.7, p.523-533, 2002.
- COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, 2002.
- COX, F. E. G. Parasitic Amoebae. In: **Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology**. 2nd. Ed., 1993.
- DAVIDSON, R.A.; FLETCHER R.H.; CHAPMAN, L.E. Risk factors for strongyloidiasis. A case control study. **Arch. Intern. Med.**, v. 144, p. 321-4, 1984.
- DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2 Ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 906p.
- DE PAOLA, D. Patologia da estrongiloidíase. **Bol. Cen. Est. Hosp. Serv. Est. (RJ)**, v. 14, p. 3, 1962.
- DE PAULA, F. M.; DE CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M.; MARÇAL, M.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 1, p. 51-5, 2000.

- DORRIS, M.; BLAXTER, M. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides stercoralis*. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 939-41, 2000.
- DORRIS, M.; VINEY, M. E.; BLAXTER, M. L. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Int J Parasitol**, v. 32, p. 1507-17, 2002.
- DREYER, G. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 10, p. 2569-71, 1996.
- ELDER, J. F.; TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, p. 297-320, 1995.
- EL-DIB, N.A. Strongyloidiasis. In: KAMEL, R.; LUMLEY, J., eds. **Textbooks of tropical surgery**. London: Westminster Publishing Ltd., p. 1035-7, 2004.
- EVANS, A. C.; MARKUS, M. B.; JOURBERT, J. J.; GUNDERS, A. E. Bushman children infected with the Nematode *Strongyloides fuelleborni*. **South African Med J.**, v. 80, p. 410-1, 1991.
- FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B; KETTANEH, A.; CABANE. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: Case series and literature review. **Journal of infection**, 2006.
- FAUST, E. C. The experimental studies on human and primate species of *Strongyloides*. The development of *Strongyloides* in the experimental host. **Am. J. Hyg.**, v. 18, p. 114-32, 1933.

- FAUST, E.C. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.
- FERREIRA, C.B.; MARÇAL, O. J. Enteroparasitoses em escolares do Distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo piloto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.5, p.373-377, 1997.
- FERREIRA, P.; RIBEIRO, M.; BATISTA, F. Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças de escola localizada em assentamento de sem-terras em Campo Florido, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.109-111, 2003.
- FLAVELL, R. B.; O'DELL, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. **Chromosoma**, v. 71, p. 135-52, 1979.
- FREEDMAN, D. O. Experimental Infection of Human Subjects with *Strongyloides* Species. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 1221-6, 1991.
- GALLEGOS, S. G. Identification of an astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitol Int.**, v. 54, p. 123-33, 2005.
- GALLIARD, H. Pathogenesis of Strongyloides. **Helminthological Abstracts** v. 36, p. 247-60, 1967.
- GASSER, R., P. NANSEN, AND P. GULDBERG. *Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE*. **Mol. Cell Probes**, v. 10, n. 2, p. 99-105, 1996.
- GENTA, R.M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical and Microbiological Reviews**, v. 5, p. 345-55, 1992.

- GEORGI, J. R.; SPRINKLE, C. L. A case of human strongyloidiasis apparently contracted from asymptomatic colony of dogs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 23, p. 899-901, 1974.
- GIAZZI, J. F.; FONSECA, L. M.; MORETTI, L. A.; GOMES, M. E. Prevalência de Enteroparasitas em habitantes da Vila Vieira da Cidade de Araraquara. **Rev. Fac. Farm. Odont.**, v. 8, n. 1, p. 53-8, 1974.
- GIAZZI, J. F.; MARTINI, A. S.; BELDA NETO, F. M.; SANTOS, J. L.; TRONCON, C. A. A. Ocorrência de Protozoários e Helminhos em Calouros da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara. **Rev. Fac. Farm. Odont.**, v. 10, suppl. 2, p. 243-46, 1976.
- GIAZZI, J. F.; MARTINI, A. S.; BUAINAIM, A.; MENDONÇA, C. P.; BELDA NETO, F. M.; SANTOS, J. L. Levantamento de Protozoários e Helminhos em Crianças de um Núcleo Populacional de Araraquara. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 43, p. 49-52, 1982.
- GRAHAM, G. L. Studies on Strongyloides. I. *S. ratti* in parasitic series, each generation in the rat established with a single homogenic larva. **Am. J. Hyg.**, v. 24, p. 71-87, 1936.
- GRILLO, L.P.; CARVALHO, L.R.; SILVA, A.C. Influência das condições sócio-econômicas nas alterações nutricionais e na taxa de metabolismo de repouso em crianças escolares moradoras em favelas do município de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.46, n.1, p.7-14, 2000.
- GROVE, D. I. Human Strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v.38, p.251-309, 1996.
- GROVE, D. I.; NORTHERN, C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 76, p. 833-8, 1982.

- GROVE, D.I. Strongyloidiasis in allied ex-prisoners of war in south-east Asia. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 598-601, 1980.
- GRYSCHER, R.C.B.; SICILIANO, R.F. Estrongiloidíase. In: **VERONESI. Tratado de Infectologia**. 3 ed. São Paulo. Atheneu, 2005.
- HANCOCK, K.; BROUGHEL, D. E.; MOURA, I. N. S.; KHAN, A.; PIENIAZEK, N. J.; GONZALEZ, A. E. Sequence variation in the cytochrome oxidaseI, internal transcribed spacer1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and central America, India, and Asia. **Inter J Parasitol**, v. 31, p. 1601-7, 2001.
- HARADA, U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Med.**, v. 1, p. 177-9, 1955.
- HILLIS, D. H.; DIXON, M. T. Ribossomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-53, 1991.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The Sedimentation method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico J. Publ. Hlth.**, v. 9, p. 281-98, 1934.
- HOSTE, H.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Inter J Parasitol**, v. 25, p. 75-80, 1995.
- HU, M.; CHILTON, N.B.; GASSER, R.B. The mitochondrial genome of *Strongyloides stercoralis* (Nematoda) – idiosyncratic gene order and evolutionary implications. **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 1393-408, 2003.

- HUNG, G. C.; CHILTON, N. B.; BEVERIDGE, I.; GASSER, R. B. Molecular systematic framework for equine *Strongylus*. **Inter J Parasitol**, v. 30, p. 95-103, 2000.
- **IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em 26 de abril de 2009.
- ITOH, N.; MURAOKA, N.; AOKI, M.; ITAGAKI, T. Prevalence of *Strongyloides* spp. infections in household dogs. **Kasenshogaku Zasshi**, v. 77, p. 430-5, 2003.
- JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROVE, P. **Disease Control Priorities in developing Countries**. Washington (DC). IBRD/The World Bank and Oxford University Press, 2006.
- JÚNIOR, A. F.; GONÇALVES-PIRES, M. R.; SILVA, D. A.; GONÇALVES, A. L.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and serological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in domesticated dogs from southeastern Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 136, n. 2, p. 137-45, 2006.
- KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 208-17, 2004.
- KIA, E. B.; RAHIMI, H. R.; MIRHENDI, H.; NILFOROUSHAN, M. R.; TALEBI, A.; ZAHABIUN, F.; KAZEMZADEH, H.; MEAMAR, A. R. A Case of Fatal Strongyloidiasis in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia and Molecular Characterization of the Isolate. **Korean J Parasitol.**, v. 46, n. 4, p. 261-3, 2008.

- KIYOTA, M. Regulatory role of testosterone on the natural defence mechanism against infection with *Strongyloides ratti* in C57BL/6 mice. **Jpn. J. Parasitol.**, v. 33, p. 49-54, 1984.
- KOBAYASHI, J.; HASEGAWA, H.; SOARES, E. C.; FORLI, A. A.; TOMA, H.; CORREIA DACAL, A. R.; BRITO, M. C.; YAMANAKA, A.; SATO, Y. Studies on Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the Agar Plate Faecal Culture Method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 4, p. 279-84, 1996.
- KREIS H. Studies on the genus *Strongyloides*. **Am. J. Hyg**, v.19, p. 450-91, 1932
- LEVINE, N.D. **Nematode Parasites of Domestic Animals and of Man**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1980, 477p.
- LITTLE, M. D. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **J. Parasitol**, v. 52, p. 69-84, 1966.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in Eukariotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-64, 1980.
- LOOSS. A. Zur Lebensgeschichte des *Ankylostoma duodenale*. **Zentralbl Bakteriol**, v.12, p. 441-9, 1898.
- LUCAS, S. B. Missing infections in AIDS. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 84 (suppl. 1), p. 34-8, 1990.

- LUDWIG, K. M.; FREI, F.; FILHO, F. A.; PAES, T. R. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 547-55, 1999.
- LUTZ, A. *O Schistosoma mansoni e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-55, 1919.
- MAC LEOD, C. L. Intestinal nematodes. In: **Parasitic Infections in Pregnancy and the Newborn**. (C. L. Mac Leod, org.), pp. 192-215, New York: Oxford University Press, 1988.
- MACEDO, H. S. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 209-13, 2005.
- MACEDO, L.M.C.; REY, L. Enteroparasitosis in pregnant and post-partem women in Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Públ.**, v. 12, n. 3, p. 383-8, 1996.
- MACHADO E. R., COSTA-CRUZ J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 161-4, 1998.
- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; PIRES, M. R. F. G.; DE OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* Alkaline Extract for the Diagnosis of Human Strongyloidiasis by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 849-51, 2003.

- MAGUIRE, J.H. Intestinal nematodes (roundworms). In: MANDELL, G.I.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R., eds. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Chuechill Livingston, p. 3260-7, 2005.
- MAIA, T.M.C.; VASCONCELOS, P.R.L.; FAUTH, S.; MOTTA NETO, R. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 118-21, 2006.
- MARTINI, A. S.; GIAZZI, J. F.; BELDA NETO, F. M.; SANTOS, J. L. Levantamento Coproparasitológico no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara. **Rev. Fac. Farm. Odont.**, v. 10, suppl. 2, p. 247-51, 1976.
- MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglicans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-59, 2000.
- MARZOCHI, M. C. A.; CAVALHEIRO, J. R. Estudos dos Fatores envolvidos na disseminação dos Enteroparasitas. Distribuição de algumas entereparasitoses em dois grupos populacionais da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 31-5, 1978.
- MASSEY Jr., H. C.; BALL, C. C.; LOK, J. B. PCR amplification of putative *gpa-2* and *gpa-3* orthologs from the (A + T)-rich genome of *Strongyloides stercoralis*. **Int J Parasitol**, v. 31, p. 377-83, 2001.
- MENDONÇA, C. P.; MARTINI, A. S.; LEITE, C. Q. F.; SALAME, M. A. L. Estudo Bacteriológico e Parasitológico em Merendeiras de Unidades Escolares da Rede Estadual de Ensino da Cidade de Araraquara. **Rev. Ciênc. Farmac.**, v. 6, p. 9-12, 1984.

- MENDONÇA, S. C.; GONÇALVES-PIRES, M. D. O. R.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus? **Acta Trop**, v. 99, n. 1, p. 102-5, 2006.
- MERCADO, R.; UETA, M.T.; CASTILHO, D.; MUNOZ, V.; SCHENONE, H. Exposure to larvae migrans syndromes in squares and public parks of cities in Chile. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 729-31, 2004.
- MINÉ, J. C.; FERNANDES, M. Z. T.; MARTINEZ, I.; ROSA, J. A. Prevalência de enteroparasitas na região de Araraquara – SP. In: **38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial, 2004, Florianópolis – SC**. CD-Room.
- MINÉ, J. C.; ROSA, J. A. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 565–9, 2008.
- MINÉ, J.C. **Diagnóstico laboratorial de blastocistose humana – Ocorrência de *Blastocystis hominis* (Brumpt, 1912) em habitantes da região de Araraquara – SP**. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas – Área de Parasitologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo. 2005.
- MIRANDA, R.A.; XAVIER, F.B.; MENEZES, R.C. Parasitismo intestinal em uma aldeia indígena Parakanã, sudoeste do Estado do Pará, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.14, n.3, p.507-11, 1998.

- MONCOL, D.J.; TRIANTAPHYLLOU, AC. *Strongyloides ransonii*: Factors influencing the in vitro development of the free-living generation. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 220-5, 1978.
- MONTEIRO C.A.; ZUÑIGA, H.P.P.; BENÍCIO, M.H.D.A.; SZARFA, S.C. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. I – Aspectos epidemiológicos, características sócio-econômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 435-45, 1986.
- MONTEIRO, C.A. **Velhos e novos males da saúde no Brasil – A evolução do País e de suas doenças**. 1ª edição, São Paulo: Hucitec, 139pp, 1995.
- MONTI, J.R., et al., *Specific amplification of Necator americanus or Ancylostoma duodenale DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications*. **Mol Cell Probes**, v. 12, n. 2, p. 71-8, 1998.
- MOORE, T. A. Identification of novel sequences and codon usage *Strongyloides stercoralis*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 79, p. 243-8, 1996.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrombiloidíase no Brasil. **Rev. Serv. Saúde Pública (RJ)**, v. 1, p. 507-24, 1948.
- MUNIZ, R.C.; QUEIROZ, M.I. Relação entre desnutrição energético-protéica, vitamina A, e parasitoses em crianças vivendo em Brasília. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.133-142, 2002.

- NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA. Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology** v. 20, n. 4, p. 353–357, 2006.
- **National Center for Biotechnology Information – NCBI**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>>. Acesso em 12 de setembro de 2009.
- NILFOROUSHAN, M.R., MIRHENDI, H., REZAIE, S., REZAIAN, M., MEAMAR, A.R., KIA, E.B. A DNA-Based Identification of *Strongyloides stercoralis* Isolates from Iran. **Iranian J Publ Health.**, v. 36, n. 3, p. 16-20, 2007.
- NZEAKO, B.C. Seasonal prevalence of protozoan parasites in Nusukka, Nigeria. **Journal of Communicable Diseases**, v. 24, p. 224-30, 1992.
- OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 119-21, 2002.
- PAULA, F. M. **Caracterização do Complexo Proteolítico Proteassoma em *Strongyloides venezuelensis***. Tese. Instituto de Biologia – UNICAMP, 2004.
- PEDRAZZANI, E. S.; MELLO, D. A.; PRIPAS, S.; FUCCI, M.; BARBOSA, C. A. A.; SANTORO, M. C. M. Helmintoses Intestinais. II – Prevalência e Correlação com renda, tamanho da família, anemia e estado nutricional. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 384-9, 1988.

- PIERANGELI, N.B.; GIAYETTO, A.L.; MANACORDA, A.M.; BARBIERI, L.M.; SORIANO, S.V.; VERONESI, A.; PEZZANI, B.C.; MINVIELLE, M.C. Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos da la ciudad de Neuquen, Patagonia, Argentina. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 259-63, 2003.
- PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 175-82, 1993.
- PRADO, M. S.; BARRETO, M.L.; SFRINA, A. et al. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.1, p. 99-101, 2001.
- PUPULIM, N.R.T.; GUILHERME, A.L.F.; FALAVIGNA, A.L.M. et al. Uma tentativa de orientar comunidades escolares no controle de parasitoses. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.28, p.130-133, 1996.
- PUTLAND, R. A. Analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Strongyloides stercoralis*. **Int J Parasitol**, v. 23, n. 1, p. 149-51, 1993.
- RAMACHANDRAN, S.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Molecular differences between several species of *Strongyloides* and comparison of selected isolates of *S. stercoralis* using a polymerase chain reaction linked restriction fragment length polymorphism approach. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, p. 61-5, 1997.
- RIVERA, E.; MALDONADO, N.; VELLEZ-GARCIA, E.; GRILLO, A. J.; MALARET, G. Hyperinfection syndrome with *Strongyloides stercoralis*. **Ann. Intern. Med.**, v. 72, p. 199-204, 1970.

- ROCHA, R. S., SILVA, J. G., PEIXOTO, S. V., CALDEIRA, R. L., FIRMO, J. O. A., CARVALHO, O. S. & KATZ, N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p.431-6, 2000.
- RODRIGUES, R.M. **Resposta imune intestinal de camundongos geneticamente deficiente em complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I ou II) infectados por *Strongyloides venezuelensis***. 2008. 76 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2008.
- RODRIGUEZ-TRELLES, F.; ALARCÓN, L.; FONTDEVILA, A. Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 7, p.1112-22, 2000.
- ROMAN-SANCHEZ, P.; PASTOR-GUZMAN, A.; MORENO-GUILLEN, S.; IGUAL-ADELL, R.; SUNER-GENEROSO, S.; TORNERO-ESTEBANEZ, C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: Analysis of the predictive factors of infection in developed countries. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 336-40, 2003.
- RON, I.G.; BERGER, S.; INBAR, M. J.; CHAITCHIK, S.; SIEGMAN-IGRA, Y. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in Israel – a case report. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 28, p. 736-8, 1992.
- ROSSI, C. L.; PARTEL, C. D.; TEIXEIRA, A. L.; TAKAHASHI, E. E.; DE BARROS-MAZON, S.; DA SILVA, L. J. Strongyloidiasis in Campinas city region (Brazil). Parasitological and serological data. **Trop. Geogr. Méd.**, v. 45, n. 4, p. 189-90, 1993.

- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides de fezes - Modificação do método de Baermann. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.
- SALATA, E.; CORRÊA, F. M. A.; SOGAYAR, R.; BARBOSA, M. A. Inquérito Parasitológico na Cecap. Distrito sede de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 6, p. 385-92, 1972.
- SALDIVA, S.R.; SILVEIRA, A.S.; PHILLIPI, S.T. et al. *Ascaris - Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. **Rev. Paediatric Perinatal Epidemiol.**, v.13, p.89-98, 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1 – 3, 2001.
- SANDGROUND, J.H. Speciation and specificity in the Nematoda genus *Strongyloides*. **J. Parasitol**, v. 12, p.59-82, 1925.
- SANTOS, K.R.; CARLOS, B.C.; PADUAN, K.S.; KADRI, S.M.; BARELLA, T.H.; AMARANTE, M.R.V.; RIBOLLA, P.E.M.; SILVA, R.J. Morphological and molecular characterization of *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae). **Journal of Helminthology**, v. 28, p. 1-7, 2009.
- SANTOS, M. A. Q.; PAÇÔ, J. M.; ISAC, E.; ALVES, E. L.; VIEIRA, M. A. Prevalência estimada de Parasitos Intestinais em Escolares de Creches e Estabelecimentos de Ensino em Goiânia – Goiás. **Rev. Pat. Trop.**, v. 19, n. 1, p. 35-42, 1990.
- SATO, H.; TANAKA, S.; UNE, Y.; TORII, H.; YOKOYAMA, M.; SUZUKI, K.; AMIMOTO, A.; HASEGAWA, H. The stomal morphology of parasitic females of *strongyloides* spp. by scanning electron microscopy. **Parasitol Res.**, v. 102, p. 541–6, 2008.

- SATO, M.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y.; KOKAZE, A.; SATO, Y. Association of a sex-related difference of *Strongyloides stercoralis* specific IgG4 antibody titer with the efficacy of treatment of strongyloidiasis. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 71, n. 1, p. 107-11, 2004.
- SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995.
- SATOH, M.; TOMA, H.; SATO, Y.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y.; KIYUNA, S.; HIRAYAMA, K. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 carriers related to enhanced expression of INF- γ and TGF- β 1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 127, p. 354-9, 2002.
- SATURNINO, A. C. R. D., MARINHO, E. J. C., NUNES, J. F. L. & SILVA, E. M. A. Enteroparasitoses em escolares de 1º grau da rede pública da cidade de Natal, RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 83-5, 2005.
- SATURNINO, A. C. R. D., NUNES, J. F. L. & SILVA, E. M. A. Relação entre a ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal – Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, p. 85-7, 2003.
- SCHLÖTTERE, C.; HAUSER, M. T.; VON HAESLER, A.; TAUTZ, D. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Region in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 513-22, 1994.
- SCHULZ, S.; KROEGER A. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north-east Brazil. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 95-103, 1992.

- SCHWARTZ, R. A.; TARLOW, M. M. Strongyloidiasis. **The Medscape Emerging and Reemerging Infectious Diseases Resource Center**, 2008. Disponível em: < <http://emedicine.medscape.com/article/229312-overview> >. Acesso em 25 de abril de 2009.
- SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v.97, p. 129-138, 1988.
- SHORMAN, M.; AL-TAWFIQ, J.A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and Gram-negative sepsis in a patient with astrocytoma. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 288-91, 2009.
- SMITH, H.V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, v. 117, p. 113-41, 1998.
- SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: Grove, D. I. **Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man**. London: Taylor & Francis, p. 11-83, 1989.
- STAINER, B.; RIEBOLD, D.; WOLFF, D.; FREUND, M.; REISINGER, E. C. *Strongyloides stercoralis* eggs in a urethral smear after bone marrow transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 1280-1, 2002.
- STONE, W. J.; SCHALFNER, W. *Strongyloides* infections in transplant recipients. **Semin. Respir. Infect.**, v. 5, p. 58-64, 1990.
- TASHIMA, N. T. & SIMÕES, M. J. S. Parasitas intestinais: prevalência e correlação com a idade e com os sintomas apresentados de uma população infantil de Presidente Prudente – SP. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 35-9, 2005.

- TAVARES-DIAS, M.; GRANDINI, A.A. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1 p.1-4, 1999.
- TEIXEIRA, A. T. L. S. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. Resumo de Tese. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 75-6, 1997.
- TIYO, R.; GUEDES, T.A.; FALAVIGNA, D.L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in southern Brazil. **J. Helminthol.** V. 82, p. 1-6. 2008.
- TRAUB, R. J.; ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R. C. A. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea growing community in northeastern India. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, p. 539-45, 2002.
- UGOCHUKWU, E. I.; EJIMADU, K. N. Studies on the prevalence of gastro-intestinal helminthes of dogs in Calabar, Nigeria. **Int J Zoonoses**, v. 12, p. 214-8, 1985.
- VENTURA, M., et al., Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiol Ecol**, v. 36, n. 2-3, p. 113-21, 2001.
- VERWEIJ, J.J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E.A.T.; POLDERMAN, A.M.; van LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 342-6, 2009.

- VIEIRA, F.M.; LIMA, S.S.; BESSA, E.C.A. Morfologia e Biometria de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linneus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae) no município de Juiz de Fora, Minas gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.15, p. 7-12, 2006.
- VILLAR, J., KLEBANOFF, M. & KESTLER, E. The effect on fetal growth of protozoan and helminthic infection during pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 74, p. 915-920, 1989.
- VILLIELA, M. M.; MOURA, N. O.; HOMSY, S. R.; FERREIRA, R. C.; MOURA, A.; ELIZALDE, J.; VARGAS, L. R.; BERNE, M. E. A. Prevalência de Parasitos Intestinais Diagnosticados no UFPel – Lab (Pelotas, RS, Brasil), Referentes a um ano de Análises. **Laes & Haes**, p. 120-8, 2002.
- WALZER, P.D.; MILDNER, J.E., BANWELL, J.G.; KILGORE, G.; KLEIN, M.; PARKER, R. Epidemiologic features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. **Am. J. Med. Hyg.**, v. 31, n. 2, p. 313-9, 1982.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research.**, v. 18, p. 7213-8, 1990.
- **World Health Organization (WHO)**. Prevention and control of intestinal parasitic infections report of a WHO Expert Committee. Geneve, 1987.
- WU, Z., et al., Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. **Parasitology**, v. 118, p. 211-8. 1999.
- ZAGO-GOMES, M. P., et al., Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 571-4, 2002.

- ZAHA, O.; HIRATA, T.; KINJO, F.; SAITO, A. Strongyloidiasis – Progress in diagnosis and treatment. **Internal. Med.**, v. 39, p. 695-700, 2000.

ANEXO

Correlações entre os parâmetros mensurados para as larvas rabditóides e filarióides de *Strongyloides stercoralis* de pacientes sintomáticos e assintomáticos da região de Araraquara – SP.

Parâmetros Correlacionados	Índices de Correlação de Spearman (r)		Significância estatística
	Sintomáticos	Assintomáticos	
CTr X CVBr	-0,0151	-0,2938	NS
CTr X CEr	0,5554	0,6409	S
CTr X CCr	0,6211	0,5842	S
CTr X CPrr	0,2564	0,3349	NS
CTr X Lr	0,4960	0,7289	S
CTr X DPCr	0,7261	0,8724	S
CTr X APri	-0,2919	0,1756	NS
CVBr X CEr	-0,1170	-0,2346	NS
CVBr X CCr	0,0755	-0,1578	NS
CVBr X CPrr	0,1024	-0,2464	NS
CVBr X Lr	-0,1962	-0,2737	NS
CVBr X DPCr	0,0809	-0,3064	NS
CVBr X APri	0,2489	-0,0595	NS
CEr X CCr	0,5627	0,4235	S
CEr X CPrr	0,1291	0,1153	NS
CEr X Lr	0,3491	0,5516	S
CEr X DPCr	0,6241	0,5983	S
CEr X APri	0,1974	0,1004	NS
CCr X CPrr	0,2948	0,0424	NS
CCr X Lr	0,2532	0,4880	NS
CCr X DPCr	0,8280	0,5441	S
CCr X APri	-0,0691	-0,0099	NS
CPrr X Lr	-0,1890	0,2535	NS
CPrr X DPCr	0,1833	0,2538	NS
CPrr X APri	0,3161	0,6238	S
Lr X DPCr	0,3966	0,6990	S
Lr X APri	-0,4697	0,1629	S
DPCr X APri	-0,2144	0,0970	NS
CTf X Cef	0,6123	0,5319	S
CTf X CCf	0,4422	0,3328	S
CTf X Lf	0,1403	0,0523	NS
Cef X CCf	0,1213	0,1600	NS
Cef X Lf	-0,0828	0,0165	NS
CCf X Lf	0,0186	-0,1351	NS

CT = Comprimento Total; **CVB** = Comprimento do Vestíbulo Bucal; **CE** = Comprimento do Esôfago; **CC** = Comprimento da Cauda; **CP** = Comprimento do Primórdio Genital; **L** = Largura; **DPC** = Distância do Primórdio Genital à Cauda; **APri** = Área do Primórdio Genital; **r** = Larva Rabditóide; **f** = Larva filarióide; **S** = Significativo (p<0,05); **NS** = Não Significativo (p≥0,05).