

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

**Seleção de scFv (*single-chain variable fragment*) contra  
proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* por Phage  
Display e sua aplicação na detecção sorológica de  
imunocomplexo na estrongiloidíase humana.**

**Marcelo Arantes Levenhagen**

**Uberlândia  
Agosto - 2014**

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

**Seleção de scFv (*single-chain variable fragment*) contra  
proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* por Phage  
Display e sua aplicação na detecção sorológica de  
imunocomplexo na estrongiloidíase humana.**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós  
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
da Universidade Federal de Uberlândia como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor.

**Marcelo Arantes Levenhagen**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Costa Cruz**

**Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart**

**Uberlândia**  
**Agosto - 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

F224p Levenhagen, Marcelo Arantes, 1980-  
2014 Seleção de scFv (*single-chain variable fragment*) contra proteínas  
totais de *Strongyloides venezuelensis* por *Phage Display* e sua aplicação  
na detecção sorológica de imunocomplexo na estrongiloidíase humana /  
Marcelo Arantes Levenhagen – 2014.  
68 f.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.

Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Estrongiloidíase – Diagnóstico - Teses. 3.  
Imunodiagnóstico - Teses. 4. Antígenos – Teses. I. Costa-Cruz, Julia  
Maria. II. Goulart, Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

**Marcelo Arantes Levenhagen**

“Seleção de scFv (Single-chain variable fragment) contra proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* por Phage Display e sua aplicação na detecção sorológica de imunocomplexo na estromgiloidíase humana”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 8 de agosto de 2014.

*Fabiana Martins de Paula*  
Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula  
USP/SP

*Vanessa da Silva Ribeiro*  
Dra. Vanessa da Silva Ribeiro  
UFG/Catalão

*Paula Batista*  
Profa. Dra. Paula Cristina Batista de F. Gontijo  
INGEB/UFU

*Santos*  
Profa. Dra. Paula de Souza Santos  
INGEB/UFU

*Julia Maria Costa Cruz*  
Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz – orientadora  
ICBIM/UFU

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Inácio F. B. Levenhagen e Maria Terezinha A. Levenhagen, pela presença fundamental ao meu desenvolvimento pessoal e pelo incentivo ao crescimento profissional.

Sem os estímulos de vocês a caminhada até aqui teria sido bem mais difícil.

À minha esposa, Maria M. M. D. Levenhagen, pela presença, colaboração, carinho e paciência em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, pelos ensinamentos e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses/UFU.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela co-orientação, pelas ideias e oportunidade de desenvolver esse estudo em conjunto com o Laboratório de Nanobiotecnologia/UFU.

Aos professores, Dr. João Marcos Madurro e Dra. Ana Graci Brito Madurro, pela oportunidade de aprendizado e colaboração com o Laboratório de Filmes Poliméricos/UFU.

Ao Prof. Dr. José César Rosa, pela auxílio com Espectrometria de Massas e pela acesso ao Laboratório de Química de Proteínas/USP.

Aos colegas dos Laboratórios acima citados pela convivência e colaboração, essencial para a realização desse estudo, especialmente: PhD. Fabiana de Almeida Araújo Santos, Msc. Patrícia Tiemi Fujimura e Msc. Renata Balvedi.

À Bióloga Maria do Rosário F. Gonçalves Pires pela convivência e presteza em todos os momentos.

Aos demais colegas dos Laboratórios de Diagnóstico de Parasitoses e Nanobiotecnologia pela convivência e troca de experiências que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

Aos professores e técnicos-administrativos do Programa de Pós graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Às agências de fomento FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Três dimensões
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , trifosfato de adenosina
AUC	<i>Area under curve</i> , área sob a curva
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> , demanda bioquímica de oxigênio
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> , soro albumina bovina
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Orto-fenilenodiamina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> , grupo de diferenciação
CDR	<i>Complementarity-determining region</i> , região determinante de complementariedade (região variável)
CID-MS/MS	<i>Collision-induced dissociation tandem mass spectrometry</i> , dissociação induzida por colisão associada a espectrometria de massas
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , ensaio imunoenzimático
Es	Especificidade
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína
FL1-A	<i>Fluorescence detector for 533/30 filters</i> , detector de fluorescência para filtros 533/30
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
Fr	<i>Framework region</i> , região conservada
Fv	<i>Variable fragment</i> , fragmento variável
g	Gravidade
G1	Amostras de soro de indivíduos positivos para estrongiloidíase humana
G2	Amostras de soro de indivíduos positivos para outras parasitoses
G3	Amostras de soro de indivíduos saudáveis
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HA	Hemaglutinina
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência

HSP	<i>Heat shock protein</i> ; proteína de choque térmico
HTLV	<i>Human T lymphotropic virus type 1</i> , vírus linfotrópico de célula T humana
IFAT	<i>Immunofluorescence antibody test</i> , teste de imunofluorescência
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil b-D-thiogalactopiranosideo
Ir	Irrelevante
IR	Índice de reatividade
kDa	kiloDalton
kHz	kiloHertz
L2	Larva rabditoide de segundo estádio
L3	Larva filarioide de terceiro estádio (infectante)
L4	Larva de quarto estádio
LB	Luria Bertani
LIPS	<i>Luciferase immunoprecipitation system</i> ; sistema de imunoprecipitação pela luciferase
LR	<i>Likelihood ratio</i> , razão de probabilidade
M	Molar
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato bibásico de sódio
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de amônio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OPD	Orto-fenilenodiamina
<i>p</i>	Nível de significância
pIII	Proteína III do capsídeo de bacteriófagos filamentosos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , salina tamponada com fosfato
PBST	PBS acrescido de tween 20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
p.i.	Pós-infecção
PM	Peso molecular
Pt	Proteínas totais
p/v	Peso por volume
ROC	<i>Receiver operating characteristic curve</i> , curva ROC
rpm	Rotações por minuto
SB	<i>Superbroth</i>
scFv	<i>single-chain variable fragment</i> ; fragmento variável de cadeia única
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate poly-acrilamide gel eletrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Se	Sensibilidade
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> , ressonância plasmônica de superfície
S. v.	<i>Strongyloides venezuelensis</i>
TA	Temperatura ambiente
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic curve</i>
Th2	T helper lymphocytes type 2, linfócitos T auxiliares tipo 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VCSM13	Bacteriófago auxiliar
VH	Cadeia pesada
VL	Cadeia leve
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
v/v	Volume por volume

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Fen	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico da estrongiloidíase humana. Adaptado ([http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Strongyloides\\_cycle.htm](http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Strongyloides_cycle.htm)) ----- 20
- Figura 2.** Esquema do processo geral de *Phage display* (A) (Adaptado de HUANG et al., 2012) e da expressão de fragmentos de anticorpos na proteína PIII do capsídeo do fago (Adaptado de SMITH et al., 2005) ----- 27
- Figura 3.** ELISA de expressão e reatividade a proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* do sobrenadante de cultura dos clones induzidos por IPTG, após transformação em *E. coli* TOP 10. Dos 96 clones analisados, 4 (A4, B4, H2 e H3) foram expressos e reativos a proteínas totais do parasito. Ir: scFv irrelevante ----- 41
- Figura 4.** Estrutura 3D do scFv selecionado (A), analisada pelo programa PyMOL, e demonstração do sítio de ligação ao antígeno (B). CDR: regiões variáveis; VL e VH: cadeias leve e pesada, respectivamente. As sequências deduzidas de aminoácidos das regiões variáveis (CDR) podem ser visualizadas em (C) ----- 42
- Figura 5.** Curva de purificação do sobrenadante de scFv por HPLC (A) e ensaio *dot blot* do scFv purificado (B) ----- 42
- Figura 6.** Identificação e caracterização da fração antigênica de *Strongyloides venezuelensis* na qual o scFv se ligou. Perfis eletroforéticos por SDS-PAGE 15% corado pelo nitrato de prata, após *pull down assay*, e analisados pelo programa Image J (A). Perfil de marcação do scFv no corpo e sistema digestivo, especificamente intestino (B - seta) e esôfago (C - seta), em larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* por imunofluorescência, utilizando conjugado anti-HA/FITC. Metacestódeo de *Taenia solium* foi utilizado para controle negativo de marcação (D). PM: padrão de peso molecular em kilodaltons (kDa); Pt *S. v.*: proteínas totais de *S. venezuelensis* ----- 43

**Figura 7.** Estrutura 3D da interação scFv/HSP60 analisada pelo programa PyMOL. As estruturas demonstram as regiões de CDR do scFv associadas à HPS60 (A), a marcação dos locais de ligação do scFv à HSP60 (B) e interação dos aminoácidos das regiões de CDR à HSP60, de visualização frontal (C) e apical (D). Os aminoácidos das regiões variáveis (CDR) que se ligam à HSP60 podem ser visualizados em (E) ----- 44

**Figura 8.** ELISA utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em *pool* de soros. A reação foi revelada com anti-IgG humana/peroxidase. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. \* $p<0,05$  ----- 45

**Figura 9.** Detecção de imunocomplexos por imunofluorescência, utilizando *beads* epoxy previamente acoplados com scFv e *pool* de soros positivos para estrongiloidíase humana (A) e outras parasitoses (B) e *pool* de soros de indivíduos saudáveis (C), marcadas com anti-IgG humana/FITC. Como controle negativo foram utilizadas *beads* acopladas com scFv e adicionadas de anti-IgG humana/FITC (D). Barra: 200 $\mu$ m ----- 46

**Figura 10.** Citometria de fluxo com *beads* previamente acopladas com scFv e adicionadas de *pool* de soros (A) e intensidade de fluorescência de cada ensaio (B). Marcação com anti-IgG humana/FITC. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. *Count*: contagem das *beads* (10.000 eventos); CN: controle negativo. \* $p<0,05$  ----- 47

**Figura 11.** Ressonância plasmônica de superfície utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em *pool* de soros (A) e variação entre o resultado final e o início da imobilização de cada *pool* de soros (B). O eletrodo de ouro foi imobilizado com as moléculas de scFv (1), bloqueado com caseína 1% (2) e as amostras de *pool* de soros foram adicionadas (3). (\*) etapas de lavagens em tampão fosfato. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. \* $p<0,05$  ----- 48

**Figura 12.** Método de ELISA utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em amostras de soros. (A) TG-ROC indicando o ponto de corte do método (*cut-off*). (B) Índice de reatividade das amostras de soros de indivíduos com estrongiloidíase (G1;  $n= 40$ ), com outras parasitoses (G2;  $n= 44$ ) e de indivíduos saudáveis (G3;  $n= 40$ ). (C) Curva ROC indicando sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de probabilidade positivo (*likelihood ratio +*; LR+). A linha tracejada indica o limiar do índice de reatividade ----- 50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais dos métodos para verificar a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos utilizando <i>pool</i> de soros -----	49
<b>Tabela 2.</b> Análise do custo-benefício dos métodos para validação do teste em duplicata utilizando 124 amostras de soro -----	49

# SUMÁRIO

RESUMO -----	xvi
ABSTRACT -----	xvii
1. INTRODUÇÃO -----	18
1.1. Epidemiologia da estrongiloidíase humana -----	18
1.2. Ciclo biológico da estrongiloidíase humana -----	19
1.3. Resposta imune, patogenia e sintomatologia -----	21
1.4. Diagnóstico parasitológico, molecular e imunológico -----	23
1.5. <i>Phage display</i> e seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv) -----	25
2. OBJETIVOS -----	29
2.1. Geral -----	29
2.2. Específicos -----	29
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	30
3.1. Aspectos éticos -----	30
3.2. Obtenção de larvas infectantes (L3) de <i>Strongyloides venezuelensis</i> -----	30
3.3. Obtenção de proteínas totais de <i>Strongyloides venezuelensis</i> -----	30
3.4. Seleção e caracterização de moléculas de scFv, obtidas por <i>Phage display</i> , frente a proteínas totais de <i>Strongyloides venezuelensis</i> -----	31
3.4.1. Seleção de scFv frente a proteínas totais de <i>Strongyloides venezuelensis</i> ---	31
3.4.2. Extração do DNA plasmidial e transformação em <i>E. coli</i> TOP10 -----	31
3.4.3. Expressão de scFv -----	32
3.4.4. Análise da expressão e especificidade dos clones de scFv por ELISA -----	32
3.4.5. Sequenciamento de DNA -----	33
3.4.6. Análise de bioinformática -----	33
3.5. Caracterização da proteína de <i>Strongyloides venezuelensis</i> na qual o scFv se liga por <i>pull-down assay</i> , imunofluorescência e espectrometria de massas -----	34
3.5.1. Produção de clone de scFv em maior escala e purificação por cromatografia de alta eficiência ( <i>high-performance liquid chromatography</i> , HPLC) -----	34
3.5.2. <i>Dot blot</i> do scFv purificado -----	34
3.5.3. <i>Pull-down assay</i> -----	35

3.5.4. Imunofluorescência ( <i>Immunofluorescence antibody test, IFAT</i> ) -----	35
3.5.5. Espectrometria de massas (CID-MS/MS) -----	36
3.5.6. Análise de bioinformática -----	36
3.6. Verificação da capacidade do scFv em detectar imunocomplexos por <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA), citometria de fluxo com <i>beads</i> epoxy e ressonância plasmônica de superfície -----	37
3.6.1. Amostras de soro -----	37
3.6.2. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) -----	37
3.6.3. Citometria de fluxo com <i>beads</i> epoxy -----	38
3.6.4. Ressonância plasmônica de superfície ( <i>surface plasmon resonance, SPR</i> ) -----	38
3.7. Determinação da acurácia diagnóstica do ELISA na detecção sorológica de imunocomplexos -----	39
3.7.1. Amostras de soro -----	39
3.7.2. ELISA -----	39
3.7.3. Análise estatística -----	40
<b>4. RESULTADOS -----</b>	<b>41</b>
4.1. Seleção, sequenciamento de DNA, purificação por HPLC e <i>Dot blot</i> de scFv -----	41
4.2. <i>Pull down assay</i> , Imunofluorescência (IFAT) e Espectrometria de Massas (CID-MS/MS) -----	43
4.3. ELISA, citometria de fluxo com <i>beads</i> epoxy e ressonância plasmônica de superfície ( <i>surface plasmon resonance, SPR</i> ) -----	45
4.4. ELISA com 124 amostras de soro -----	50
<b>5. DISCUSSÃO -----</b>	<b>51</b>
<b>6. CONCLUSÕES -----</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>57</b>

## RESUMO

A estrongiloidíase é uma helmintíase de condição negligenciada que não apresenta um padrão ouro de diagnóstico parasitológico devido à liberação intermitente de larvas nas fezes. A permanência do parasito no hospedeiro pode levar a quadros de cronificação e hiperinfecção. Fragmentos de anticorpos recombinantes (*single-chain variable fragment*, scFv) têm sido empregados no desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais eficazes. O objetivo do presente estudo foi obter scFv por *Phage Display*, a partir de uma biblioteca combinatorial, frente a proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis*, e sua posterior aplicação no diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana pela detecção de imunocomplexos. Após dois ciclos de seleção, os clones de scFv que reagiram frente a proteínas totais do parasito foram caracterizados por sequenciamento. Para se caracterizar o componente antigenônico do extrato total no qual a molécula de scFv se ligou foram realizados os ensaios de *pull-down*, imunofluorescência (*Immunofluorescence antibody test*, IFAT) e espectrometria de massas (CID-MS/MS). A capacidade do scFv em detectar imunocomplexos foi verificada por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), citometria de fluxo utilizando *beads* magnéticos e ressonância plasmônica de superfície (SPR), utilizando *pool* de soro de indivíduos positivos para estrongiloidíase, positivos para outras parasitoses e saudáveis. Foi realizado o ELISA *sandwich* utilizando scFv para detectar imunocomplexos em 124 amostras de soro de indivíduos, sendo: 40 positivos para estrongiloidíase; 44 positivos para outras parasitoses e 40 saudáveis. A acurácia diagnóstica do método foi determinada pelos dados da curva ROC. Dos 96 clones, 4 (A4, B4, H2 e H3) reagiram frente a proteínas totais do parasito e a análise do sequenciamento demonstrou que os quatro clones apresentavam a mesma sequência deduzida de aminoácidos. O SDS-PAGE 15%, após ensaio *pull-down*, demonstrou que o scFv foi capaz de se ligar a uma fração antigenônica de ~65kDa de *S. venezuelensis*, presente no corpo e sistema digestivo das larvas infectantes (L3), como verificado por IFAT. Os resultados obtidos por CID-MS/MS e análises de bioinformática evidenciaram que essa fração antigenônica apresenta alta similaridade com a proteína de choque térmico (HSP60) de *Strongyloides* sp., uma importante proteína envolvida na relação parasito-hospedeiro. Os métodos de ELISA, citometria de fluxo e SPR demonstraram a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos com estrongiloidíase e diferenciar de *pool* de soros de indivíduos com outras parasitoses e saudáveis. O ELISA *sandwich* com 124 amostras de soro apresentou elevada acurácia diagnóstica, com 97,50% de sensibilidade, 98,81% de especificidade, área sob a curva de 0,9993 e razão de probabilidade de 81,90. Nesse estudo, obteve-se sucesso na seleção e caracterização de scFv que se liga a uma fração antigenônica específica do parasito e que se mostrou inovador e eficaz no diagnóstico da estrongiloidíase humana.

**Palavras-chave:** estrongiloidíase humana, diagnóstico, *Phage display*, scFv, imunocomplexos

**Selection of scFv (single-chain variable fragment) against total proteins of *Strongyloides venezuelensis* by Phage Display and its application in the serological detection of immune complex in human strongyloidiasis**

## **ABSTRACT**

Strongyloidiasis is a helminthiasis of neglected condition that has no gold standard of parasitological diagnosis due to the intermittent release of larvae in feces. The maintenance of the parasite in the host can lead to chronicity and hyperinfection. Recombinant antibody fragments (single-chain fragment variable, scFv) have been used in the development of more effective methods of diagnosis. The aim of this study was to obtain scFv by Phage Display, from a combinatorial library, against total proteins of *Strongyloides venezuelensis*, for its further application in the serological diagnosis of human strongyloidiasis by immune complexes detection. After two cycles of selection, the scFv clones that reacted against the total proteins of the parasite were characterized by sequencing. To characterize the antigenic component of the total extract in which the scFv molecule bound, the pull-down assay, immunofluorescence antibody test (IFAT) and mass spectrometry (CID-MS/MS) were performed. The ability of scFv to detect the immune complexes was verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), flow cytometry using magnetic beads and surface plasmon resonance (SPR), using serum pool of individuals positive for strongyloidiasis, positive for other parasites and healthy. It was performed the sandwich ELISA using scFv for detecting immune complexes in 124 serum samples from individuals: 40 positive for strongyloidiasis; 44 positive for other parasitic diseases and 40 healthy. The diagnostic accuracy of this method was determined by the data of the ROC curve. Of the 96 clones, 4 (A4, B4, H2 and H3) reacted against total proteins of the parasite and sequencing analysis showed that the four clones had the same deduced amino acid sequence. The 15% SDS-PAGE, after pull-down assay, demonstrated that the scFv was able to bind to an antigenic fraction of ~65kDa from *S. venezuelensis*, present in the body and digestive system of infective larvae (L3), as verified by IFAT. The results obtained by CID-MS/MS and bioinformatics analysis showed that this antigenic fraction presents high similarity with heat shock protein (HSP60) of *Strongyloides* sp., an important protein involved in host-parasite relationship. The ELISA, flow cytometry and SPR methods demonstrated the ability of scFv to detect immune complexes in pool of sera from individuals with strongyloidiasis and differentiate from the pool of sera from individuals with other parasitic diseases and healthy. The sandwich ELISA with 124 serum samples showed high diagnostic accuracy with 97.50% sensitivity, 98.81% specificity, area under the curve of 0.9993 and likelihood ratio of 81.90. In this study, success was obtained in the selection and characterization of a scFv that binds to a specific antigenic fraction of the parasite and that proved to be innovative and effective in the diagnosis of human strongyloidiasis.

**Keywords:** human strongyloidiasis, diagnosis, Phage Display, scFv, immune complexes

## 1. INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase humana é uma parasitose intestinal causada por nemátodeos do gênero *Strongyloides*. O gênero pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditia e família Strongyloididae e engloba 52 espécies, sendo que somente duas espécies podem causar infecção no homem: *Strongyloides stercoralis* (BAVAY, 1876) e *Strongyloides fuelleborni* (VINEY et al., 1991). Considerando somente infecções agudas, a estrongiloidíase é uma das principais parasitoses intestinais em humanos. Devido ao grande número de pessoas potencialmente expostas ou com infecções subclínicas não diagnosticadas, essa parasitose apresenta-se como condição negligenciada (OLSEN et al., 2009; BISOFFI et al., 2013; RAMÍREZ-OLIVENCIA et al., 2014).

Há grande variedade de técnicas utilizadas para o diagnóstico dessa parasitose, todas com vantagens e desvantagens, e com características únicas para objetivos específicos. O diagnóstico parasitológico é rotineiramente utilizado para a detecção do parasito devido ao seu custo, entretanto é pouco sensível (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Isso se deve, principalmente, à liberação pequena e irregular de larvas nas fezes, sendo necessário a coleta de sete amostras para se ter sensibilidade de 100%. A dificuldade na detecção da infecção culmina na permanência do parasito no corpo do hospedeiro por anos, resultando em cronificação (SCHÄR et al., 2013).

Uma característica importante dessa infecção parasitária se dá pela possibilidade de autoinfecção em que grande quantidade de larvas infectantes presentes no intestino se disseminam para outros órgãos. Esse processo é mais frequente em indivíduos infectados submetidos a diversos fatores imunossupressores (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Considerando a magnitude da estrongiloidíase e a importância do diagnóstico precoce, há necessidade de desenvolver metodologias que sejam inovadoras, devido a possibilidade de cronificação, hiperinfecção e disseminação, que podem ser fatais nos quadros de imunossupressão (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

### 1.1. Epidemiologia da estrongiloidíase humana

A estrongiloidíase humana destaca-se como parasitose de grande distribuição mundial. A infecção por *S. fuelleborni* é restrita a alguns países da África e Ásia. A taxa de infecção

por *S. stercoralis* pode atingir cerca de 100 milhões de indivíduos, com predominância em regiões tropicais e subtropicais. (SCHÄR et al., 2013; BUONFRATE et al., 2014). As regiões mundiais foram diferenciadas de acordo com a prevalência da infecção por *S. stercoralis* em esporádica ou de baixa endemicidade (<1%), endêmica ou de média endemicidade (1-5%) e hiperendêmica ou de alta endemicidade (>5%) (STUERCHLER, 1981 apud PIRES; DREYER, 1993). As áreas de alta endemicidade estão concentradas no países em desenvolvimento delimitados pelos trópicos, que apresentem condições sanitárias precárias, bem como condições de umidade, temperatura e de solo ideais ao desenvolvimento parasitário. Nos países desenvolvidos, as taxas de infecção estão diretamente relacionadas a sua detecção em viajantes ou refugiados, assim como de imigrantes de áreas endêmicas (SCHÄR et al., 2013).

No Brasil, a importância dessa parasitose e seu agente etiológico foi relatada pela primeira vez por Ribeiro da Luz em 1880. O estados que apresentam as maiores taxas de prevalência são: Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (COSTA-CRUZ, 2011). Em Uberlândia-MG, a ocorrência da estrongiloidíase humana foi demonstrada em diferentes amostras populacionais: 3,3% em crianças hospitalizadas (PAULA et al., 2000); 3,8% em diabéticos (MENDONÇA et al., 2006); 4,4% em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009); 5% em idosos (NAVES; COSTA-CRUZ, 2013); 9,15% em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO et al., 2008a); 12% em indivíduos infectados pelo HIV (SILVA et al., 2005), 13% em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998) e 33,3% em alcoolistas (OLIVEIRA et al., 2002).

## 1.2. Ciclo biológico da estrongiloidíase humana

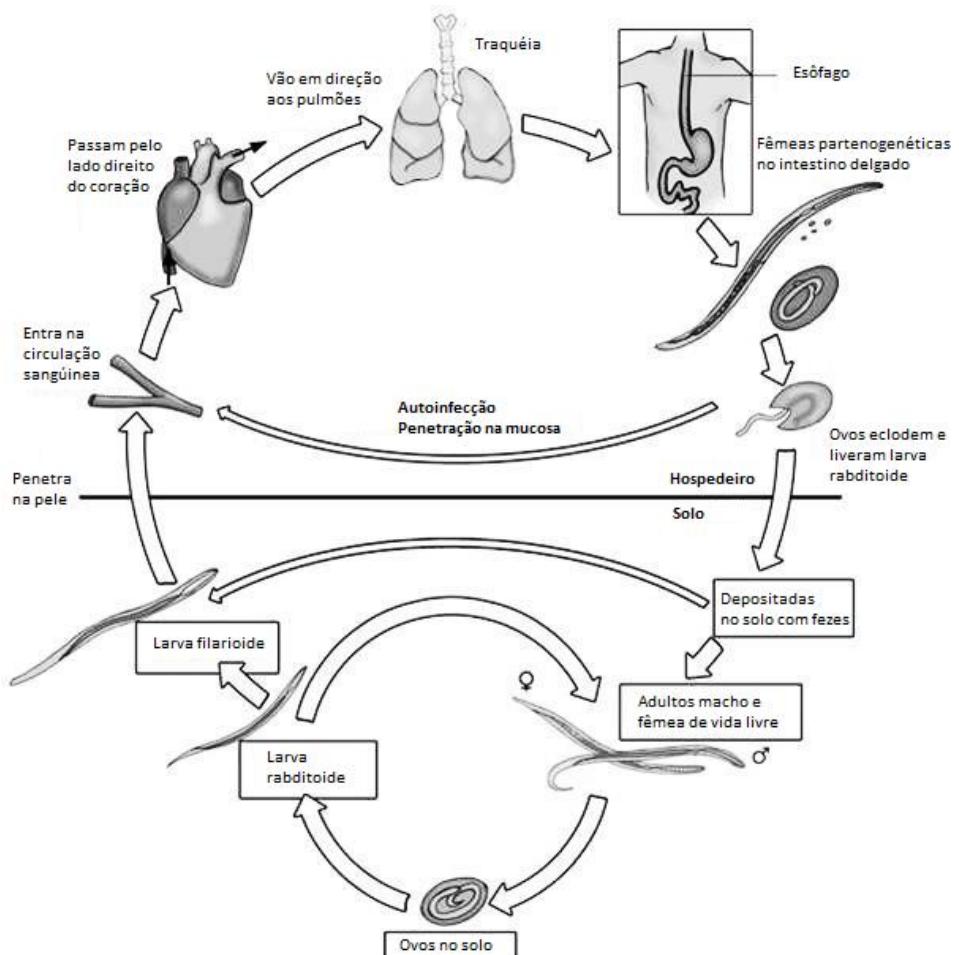
A infecção pelo *S. stercoralis* apresenta dois modos de transmissão: primoinfecção ou heteroinfecção e autoinfecção. A primoinfecção ocorre pela penetração ativa de larvas filarioides (L3) na pele e mucosas do hospedeiro. Após realizar o ciclo de Loss, a larvas (L4) são deglutidas e alcançam o intestino delgado. As larvas transformam-se em fêmeas partenogenéticas, alojando-se nas glândulas de *Lieberkühn*, onde iniciam a postura dos ovos. Os ovos larvados eclodem na mucosa liberando as larvas rabditoides (L2), que podem ser triploides (3n), diploides (2n) ou haploides (1n) (COSTA-CRUZ, 2011).

No meio externo, dependendo das condições ambientais, essas larvas desenvolverão o ciclo direto ou indireto. O ciclo direto caracteriza-se pela transformação das larvas rabditoides (3n) em larvas filarioides L3 (3n) que são as formas infectantes do parasito. O ciclo indireto

ou de vida livre caracteriza-se pelo desenvolvimento das larvas rabditoides 2n e 1n, em fêmeas diploides e machos haploides respectivamente que, por reprodução sexuada, darão origem a ovos, larvas rabditoides e posteriormente, larvas filarioides infectantes (L3). O período pré-patente para *S. stercoralis* em humanos é de aproximadamente 8-25 dias (COSTA-CRUZ, 2011).

Outra forma de transmissão é a autoinfecção, que ocorre pela transformação de larvas L2 em L3 na região perianal e penetração ativa da L3 infectante nessa região (forma externa) ou, pela transformação de larvas L2 em L3 na mucosa intestinal, e penetração ativa das larvas L3 na região do íleo e cólon (forma interna). Esse modo de infecção aumenta a carga parasitária do paciente, sendo responsável pela longa permanência do parasito no hospedeiro e se caracteriza por ser o principal fator de desenvolvimento das formas graves de estrongiloidíase como a hiperinfecção e disseminação dos parasitos a outros órgãos devido a vários fatores imunossupressores (MARCOS et al., 2011; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

Na figura 1 observa-se o ciclo da estrongiloidíase humana.



**Figura 1.** Ciclo biológico da estrongiloidíase humana

Adaptado ([http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Strongyloides\\_cycle.htm](http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Strongyloides_cycle.htm))

### 1.3. Resposta imune, patogenia e sintomatologia

A interação entre *S. stercoralis* e o hospedeiro humano é complexa devido a sua capacidade intrínseca de desenvolvimento, de modo que os indivíduos infectados podem apresentar três modos de evolução da doença: erradicação da infecção, cronificação e hiperinfecção, com possibilidade de disseminação, decorrentes da autoinfecção (COSTA-CRUZ, 2011). A infecção por *S. stercoralis* é normalmente auto limitada e de baixa morbidade em indivíduos imunocompetentes, tornando-se grave nos quadros de imunossupressão (MARCOS et al., 2008; MARCOS et al., 2011; BUONFRATE et al., 2013).

Devido à complexidade da interação parasito-hospedeiro pouco se sabe dos mecanismos e estratégias de evasão imune desenvolvidos por esse parasito. A maioria dos estudos envolvendo a resposta imune frente a helmintos, em modelos experimentais, demonstra a participação da resposta imune celular e humoral. De modo geral, as respostas imunes dos hospedeiros frente a parasitos se iniciam pela apresentação de抗ígenos aos linfócitos T CD4+ de perfil Th2, via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) classe II, desempenhando suas funções na imunidade adaptativa, com a produção de interleucinas específicas dessa via de sinalização como IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13 (JANKOVIC et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013).

Essas citocinas de perfil Th2 induzem rápida resposta humoral mediada por IgA e IgE, e resposta celular mediada por eosinófilos, basófilos e mastócitos, fundamentais nos processos de eliminação de larvas e vermes (MARCOS et al., 2011). A hipersensibilidade mediada pela IgE antígeno-específica é a resposta imune efetora mais rápida frente aos parasitos (GALIOTO et al., 2006). Por sua vez, a IgA, que proporciona proteção de mucosa frente a parasitos, é a segunda imunoglobulina mais prevalente no soro e representa a mais proeminente classe na superfície de mucosa e secreções seromucosas como saliva, lágrima, colostrum e líquor (MESTECKY; RUSSEL, 2009; RIBEIRO et al., 2010).

Níveis elevados de IgE são demonstrados em pacientes imunocompetentes com estrongiloidíase, entretanto, nos casos de hiperinfecção em indivíduos com imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade. A IgM *Strongyloides*-específica, que demonstra infecção recente por *S. stercoralis*, apresenta o pico de produção uma semana pós-infecção (p.i.) e mantém os níveis elevados por mais de duas ou três semanas. Títulos de IgG são notados duas semanas p.i., com um pico em torno da sexta semana que persiste por até 20 semanas p.i. O ciclo do parasito sugere também que ele pode estimular a resposta local sistêmica mediada por anticorpos IgA. Indivíduos sintomáticos

graves, devido a fatores imunossupressores, podem apresentar redução significativa da concentração de IgA e IgM, entretanto não há alteração de IgG (COSTA-CRUZ, 2011). Na elaboração da resposta imune frente a *S. stercoralis* prevalece principalmente IgG1 e IgG4. Acredita-se que IgG1 tenha um papel protetor frente a infecção e que IgG4 esteja envolvida no bloqueio da resposta protetora promovida pela IgE, reduzindo a expulsão dos parasitos (RODRIGUES et al., 2007).

Na resposta imune frente ao parasito também há participação do mecanismo T-independente, através da ativação de macrófagos e consequente produção de citocinas como fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), além de mediadores da inflamação antígeno-inespecíficos. Essas citocinas atuam nas glândulas caliciformes do intestino estimulando a produção de muco, que tem a função de revestir as fêmeas partenogenéticas evitando seu estabelecimento na mucosa e promovendo sua eliminação do intestino. As mucinas representam, portanto, a primeira linha de defesa do hospedeiro frente a helmintos (MACHADO et al., 2005). Os antígenos das larvas L3 de *S. stercoralis* ativam as vias clássicas e alternativas do complemento, permitindo a aderência de monócitos do sangue periférico e de células polimorfonucleares à superfície dessas larvas, lisando-as. Umas das estratégias de evasão do helminto são as proteases secretadas pelo parasito, que clivam as proteínas do complemento (COSTA-CRUZ, 2011).

A migração e mudas das larvas filarioïdes podem provocar rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado inflamatório. Em casos mais graves pode levar ao desenvolvimento da Síndrome de Löeffler, com edema pulmonar e insuficiência respiratória (COSTA-CRUZ, 2011). A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa intestinal resultam em reação inflamatória, podendo acarretar na síndrome da má absorção, diarreia crônica com perda proteica, hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia, anemias e eosinofilia (FARDET et al., 2007). Nas alterações patológicas onde a carga parasitária é maior, a enterite é ulcerativa, resultando em inflamação com eosinofilia intensa e ulcerações com invasão bacteriana, sendo posteriormente substituídos por tecido fibrótico, acarretando na rigidez da mucosa intestinal (JUCHEMS et al., 2008).

Os indivíduos infectados são assintomáticos na maioria dos casos, podendo apresentar casos de desconforto abdominal, de modo que a maioria dos sintomas apresentam-se como manifestações clínicas brandas. Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes na maioria dos indivíduos infectados, caracterizando por tosse com ou sem expectoração, dispneia, crises asmatiformes decorrentes das larvas filarioïdes e ocasionalmente de fêmeas (MIRDHA et al., 2009; KUNST et al., 2011). Os sintomas

decorrentes desses processos são semelhantes a outras infecções parasitárias, dificultando o diagnóstico clínico (AGRAWAL et al., 2009).

As manifestações extraintestinais podem levar a quadros graves, potencialmente fatais, em indivíduos imunocomprometidos por diferentes fatores tais como: desnutrição severa, alcoolismo, diabetes mellitus tipo 2, tuberculose, tratamentos imunossupressores em indivíduos com câncer, doenças auto imunes ou pós-transplantes, indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1), pacientes portadores de HIV e indivíduos com sepse (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; MARCOS et al., 2011; IZQUIERDO et al., 2013; IORI et al., 2014). Assim, a sintomatologia da estrongiloidíase não está somente relacionada à carga parasitária, mas também a fatores do hospedeiro (RETS et al., 2013). Nesses pacientes com hiperinfecção devido à imunossupressão, há possibilidade de diagnosticar as formas parasitárias através do exame da secreção do lavado brônquico e do fluido alveolar, análise da secreção respiratória por microscopia fluorescente, sangue periférico e fluido cerebroespinhal, além de biópsia do sistema digestivo (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

#### **1.4. Diagnóstico parasitológico, molecular e imunológico**

Diversos métodos parasitológicos e técnicas de biologia molecular têm sido descritos com o objetivo de se diagnosticar a estrongiloidíase humana. O exame parasitológico é utilizado com frequência para a identificação de larvas rabditoides nas fezes (KNOPP et al., 2014). Dentre os métodos realizados que possibilitam essa identificação, os métodos de Baermann (BAERMANN, 1917) e cultura em placa de ágar (ARAKAKI et al., 1988) vêm apresentando os melhores valores de diagnóstico (INÊS et al., 2011). De modo geral, devido à liberação pequena e irregular de larvas nas fezes os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade. Por isso é estabelecido como ideal a coleta de um maior número de amostras. Foi demonstrado que com a coleta de no mínimo sete amostras de fezes em dias alternados pode-se aumentar a sensibilidade do teste (UPARANUKRAW et al., 1999; KNOPP et al., 2008). No entanto, como o exame de várias amostras é bastante incoveniente para o paciente, e consome muito tempo, muitos médicos relutam em solicitá-lo (HIRA et al., 2004).

Entre as técnicas de biologia molecular desenvolvidas até hoje para diagnóstico da estrongiloidíase destaca-se a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). Essa metodologia apresenta uma ampla variedade de funções; entretanto, no diagnóstico da estrongiloidíase, a técnica de PCR tem sido aplicada na detecção do parasito

nas fezes. É uma técnica que vem apresentando resultados promissores, com elevada sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do parasito (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2011; SITTA et al., 2014). A maior dificuldade relatada na obtenção de melhores resultados envolve a padronização da técnica devido a alguns fatores: presença de inibidores da reação de PCR presentes nas fezes, presença de uma resistente cutícula na superfície do parasito dificultando o processo de extração do DNA e à pequena quantidade de amostra que se utiliza para realizar a PCR, em comparação a outros métodos, o que pode resultar em resultados falso negativos. Outro aspecto importante dessa metodologia é que embora a técnica de PCR esteja sendo utilizada com maior frequência nos países emergentes, sua aplicação é restrita a poucos locais, uma vez que na maioria dos países endêmicos para a estrongiloidíase humana, onde os recursos financeiros são escassos, faz-se necessário a análise do custo-benefício e comparação a outros métodos de diagnóstico (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

A maior limitação na padronização de testes sorológicos mais específicos está na dificuldade de se obter larvas infectantes de *S. stercoralis*. Devido a essa dificuldade tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos provenientes de *Strongyloides cebus*, *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis* (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Machado e colaboradores (2008b) realizaram a caracterização antigênica de oito cepas de *S. venezuelensis* utilizando amostras de soros de indivíduos positivos para *S. stercoralis*, sendo reconhecida uma fração antigênica de 45 kDa, comum às oito cepas, por anticorpos anti-*S. stercoralis*, por *immunoblotting*. Os resultados demonstraram ainda valores de 93% de sensibilidade e 100% de especificidade para os testes IFAT e ELISA.

Uma análise de transcriptoma de *S. stercoralis* com outros nematoides incluindo *S. ratti* revelou similaridade na transcrição de moléculas que possuem papéis chave no processo de interação parasito-hospedeiro, assim como moléculas importantes no diagnóstico, como proteínas de secreção/excreção (MARCILLA et al., 2012). Outra similaridade entre as espécies está na produção e secreção de metaloproteases pelas larvas infectantes durante o processo de penetração na pele. Larvas infectantes de *S. venezuelensis* possuem metaloprotease dependente de zinco de 40kDa, análoga à proteína SS40 de *S. stercoralis*, com um importante papel na penetração da pele (YOSHIDA et al., 2011). Assim, a composição antigênica é bastante semelhante entre as espécies de *Strongyloides* sp., sendo que outras espécies também podem ser utilizadas na obtenção de antígeno heterólogo e sua consequente

aplicação no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana, substituindo o antígeno de *S. stercoralis* (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

Os métodos imunológicos apresentam a vantagem de demonstrarem elevada sensibilidade em comparação aos métodos parasitológicos, além de serem úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro e na utilização em inquéritos soroepidemiológicos. Apesar das dificuldades na obtenção e fracionamento de antígenos, assim como padronização das técnicas, diversos métodos imunológicos têm sido descritos (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; BISOFFI et al., 2014). Dentre aqueles que apresentam maiores valores de sensibilidade e especificidade destacam-se: *Immunofluorescence antibody test* (IFAT), utilizando diversas preparações antigênicas direcionadas para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos; *Immunoblotting* e *Luciferase Immunoprecipitation Systems* (LIPS) considerados altamente sensíveis e específicos na detecção de anticorpos no soro de indivíduos com estrongiloidíase; e *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

A técnica de ELISA é extremamente útil e compreende um dos principais métodos utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Esse método permite a detecção de anticorpos, antígenos e imunocomplexos em diversas amostras biológicas. Essa técnica é considerada superior a outros testes sorológicos no que diz respeito à praticidade assim como disponibilidade e custo dos reagentes. Entretanto, apesar do alto nível de sensibilidade, uma das maiores dificuldades na elaboração desse teste está na possibilidade de reação cruzada com outras infecções parasitárias. Por isso, a preparação antigênica compreende uma das etapas cruciais do processo, com o objetivo de se elaborar métodos imunológicos mais confiáveis (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Para esse fim, diferentes técnicas de preparação antigênica foram desenvolvidas com a finalidade de se obter antígenos que possibilitem uma maior especificidade nos testes como: fracionamento por Triton X-114 (FELICIANO et al., 2010), cromatografia de afinidade (GONZAGA et al., 2011), obtenção de proteínas recombinantes (RAMANATHAN et al., 2008; KROLEWIECKI et al., 2010) e seleção de peptídeos fusionados a fagos (FELICIANO et al., 2014).

### **1.5. Phage Display e seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv)**

*Phage Display* é uma metodologia que proporciona a seleção de peptídeos ou proteínas expressos em bacteriófagos, a partir de bibliotecas. Após se ligarem especificamente a outras moléculas de interesse são aplicados em estudos de diagnóstico e vacinas (SANTOS et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014). De acordo com a metodologia, um segmento de DNA

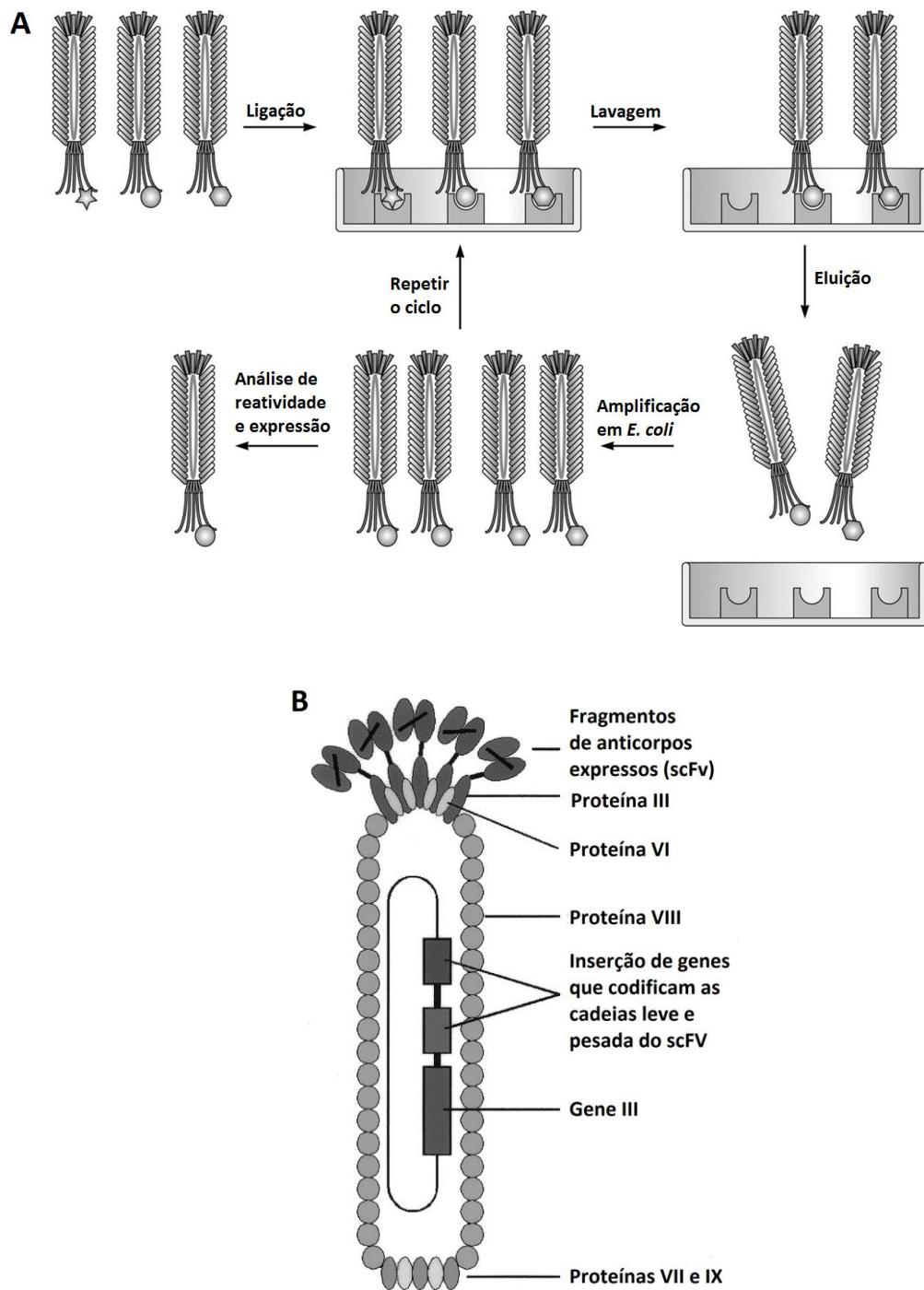
codificante é inserido no genoma de fagos filamentosos, e o peptídeo ou proteína são expressos fusionados a alguma proteína do capsídeo do fago. Desse modo, uma biblioteca de bacteriófagos apresenta grande variabilidade, com possibilidade de selecionar peptídeos ou proteínas ligantes a diferentes alvos. É uma tecnologia vantajosa uma vez que, após infecção de *Escherichia coli* pelos fagos selecionados, há a produção de proteínas solúveis, com baixo custo, fácil manuseio e rapidez (BENHAR, 2001).

Os fagos filamentosos, como M13, pertencem à família Inoviridae de bacteriófagos e possuem um DNA de fita simples como material genético. A partícula viral é composta pelo genoma viral e por cinco proteínas estruturais no seu capsídeo (pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX). A pIII está relacionada à infectividade do fago e a infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao pilus F de uma *E. coli*. O gene da pIII é um dos locais frequentemente utilizados para inserção do DNA codificante de um peptídeo ou proteína, de modo que esses serão expressos fusionados a pIII na superfície do fago. Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas induzem preferencialmente um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

O processo de seleção de peptídeos ou proteínas expressos em fagos, a partir de uma biblioteca combinatorial, frente a um alvo qualquer, compreende duas etapas: o *biopanning* (seleção por afinidade) e *screening* (triagem). No processo de *biopanning*, a biblioteca fagos é incubada com o alvo de escolha, para que ocorra a interação com este. Os fagos selecionados (ligantes) podem ser eluídos com o uso de condições que desfavoreçam a ligação destes com a molécula alvo, como aplicação de gradientes de pH sem que haja, no entanto, um comprometimento da infectividade do fago (BRIGIDO; MARANHÃO, 2002). Os fagos recuperados são amplificados por infecções sequenciais em *E. coli* e no final do processo obtêm-se vários clones, sendo selecionados os ligantes mais específicos pelo processo de *screening* (KRETZSCHMAR; VON RUDEM, 2002). De modo geral, são realizados três ciclos de seleção, que resultam no enriquecimento dos fagos específicos frente ao alvo de interesse e na exclusão de fagos não específicos (Figura 2A) (BARBAS III et al., 2001).

Uma possibilidade de utilização da técnica de *Phage Display* envolve a seleção de fragmentos de anticorpos monoclonais, como alternativa aos anticorpos monoclonais obtidos pela técnica de hibridoma. Fragmentos de cadeia única das regiões variáveis de anticorpos (*single-chain variable fragment*, scFv) foram desenvolvidos primeiramente por Bird et al. (1988) e Huston et al. (1988), e representa o menor domínio funcional de cadeias leve e

pesada (VL e VH) de um anticorpo necessário à ligação específica ao seu antígeno (WEISSER; HAL, 2009). A expressão desses fragmentos é realizada na forma de fragmentos recombinantes de anticorpos, através da fusão das regiões codificadoras da porção variável do anticorpo (Fv) ao gene III do fago M13, sendo capaz de codificar e expressar o scFv na proteína PIII do fago (Figura 2B) (VAUGHAN et al., 1996).



**Figura 2:** Esquema do processo geral de *Phage display* (A) (Adaptado de HUANG et al., 2012) e da expressão de fragmentos de anticorpos na proteína PIII do capsídeo do fago (Adaptado de SMITH et al., 2005).

A possibilidade de expressar scFv na superfície de bacteriófagos possibilitou a seleção de fragmentos de anticorpos antígeno-específicos sem a necessidade de utilização da técnica de hibridomas, reduzindo o tempo de sua produção (McCAFFERTY et al., 1990; WEISSER; HAL, 2009). Uma vez selecionados, os anticorpos de interesse podem ser sintetizados em grande escala e serem utilizados em ensaios químicos, fisiológicos e imunológicos.

O processo de *biopanning* tem sido eficiente na seleção de fragmentos de anticorpos a componentes antigênicos de parasitos. Fragmentos de anticorpos foram selecionados frente a proteínas de superfície de *Schistosoma mansoni* para caracterização de抗ígenos imunogênicos (SEPULVEDA et al., 2010) e com o objetivo de selecionar抗ígenos de *Taenia solium* para serem aplicados no diagnóstico imunológico da neurocisticercose (RIBEIRO et al., 2013). Esses estudos demonstraram a importante aplicabilidade dos fragmentos de anticorpos na caracterização imunogênica de抗ígenos parasitários, possibilitando sua utilização na caracterização proteica e molecular de parasitos. Desse modo, a seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes frente a proteínas totais de *S. venezuelensis* poderá possibilitar a seleção eficaz de um clone específico a uma determinada proteína do parasito e a elaboração de um método que tenha elevada acurácia para o diagnóstico imunológico da estrongiloidíase humana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Selecionar fragmentos de anticorpos (scFv, *single-chain variable fragment*) frente a proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* por *Phage Display*, e aplicar no diagnóstico sorológico de imunocomplexos na estrongiloidíase humana.

### 2.2. Específicos

- Selecionar e caracterizar as moléculas de scFv, obtidas por *Phage Display*, frente a proteínas totais de *S. venezuelensis*;
- Caracterizar a fração antigênica de *S. venezuelensis* na qual o scFv selecionado se liga, por *pull-down assay*, imunofluorescência e espectrometria de massas;
- Verificar a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos e discriminar *pool* de soros de indivíduos com estrongiloidíase em relação a outras parasitoses e saudáveis, por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), citometria de fluxo com *beads* epoxy e ressonância plasmônica de superfície;
- Determinar a acurácia diagnóstica do ELISA, utilizando scFv para detectar imunocomplexos em amostras de soro humano.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados em 2012 (nº de protocolo: 116.610) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com adendo em 2013, de protocolo número 307.605.

#### **3.2. Obtenção de larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis***

A cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU). Os animais foram inoculados com larvas infectantes (L3), por via subcutânea. Após 7 dias de infecção, as fezes foram recolhidas para a preparação de culturas em carvão. Após 3 dias de cultura a 27°C em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), as larvas L3 foram recuperadas (RUGAI et al., 1954), lavadas 3 vezes em salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) (0,01M; pH 7,2), centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos e armazenadas a -20°C até sua utilização.

#### **3.3. Obtenção de proteínas totais de *S. venezuelensis***

A obtenção de proteínas totais de *S. venezuelensis* foi realizada de acordo com Gonzaga e colaboradores (2011), utilizando larvas L3. As larvas foram ressuspensas em PBS 0,01M (pH 7,2), contendo inibidores de protease e submetidas a cinco ciclos de congelamento (1 minuto, -96°C) e descongelamento/sonicação (5 minutos, 40kHz, 4°C) (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil). Após incubação *overnight* a 4°C, sob agitação constante, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm (DuPont Sorvall Products Newton, Bridgeport, CT, EUA) durante 30 minutos a 4°C. A quantificação proteica do sobrenadante, contendo as proteínas totais, foi realizada de acordo com Lowry e colaboradores (1951). O extrato proteico foi armazenado a -20°C até sua utilização.

### 3.4. Seleção e caracterização de moléculas de scFv, obtidas por *Phage Display*, frente a proteínas totais de *S. venezuelensis*

#### 3.4.1. Seleção de scFv frente a proteínas totais de *S. venezuelensis*

A seleção de clones de scFv frente a proteínas totais de *S. venezuelensis* foi realizada utilizando uma biblioteca de fagos contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  sequências combinatórias de scFv, desenvolvida por Ana Paula Carneiro no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU e já utilizada frente a alvos tumorais (CARNEIRO et al., 2014) e outras doenças infecciosas (dados não publicados).

Foram realizados dois ciclos de seleção, sendo precedidos pela reamplificação da biblioteca de scFv em *Escherichia coli* XL1-Blue competentes e infecção do fago auxiliar VCSM13 para a montagem e replicação das proteínas virais (BARBAS III et al., 2001). Um poço de uma placa de microtitulação (Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foi sensibilizado com 50 µL de proteínas totais de *S. venezuelensis* (1 µg/poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 8,6) e incubado por 18 horas a 4°C. O poço foi bloqueado com 250 µL de PBST 0,05%/BSA 5% (salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20 0,05% (v/v) e soro albumina bovina 5% (p/v)) durante 1 hora a 37°C, e lavado três vezes com PBS. Em seguida, 100 µL da biblioteca de fagos-scFv foram adicionados ao poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Posteriormente, o poço foi lavado 10 vezes com PBST 0,1%. Os fagos ligados às proteínas totais foram eluídos com 100 µL de glicina-HCl 100mM (pH 2,2) durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA). A suspensão foi neutralizada com 16,5 µL de Tris 2M (pH 9,1). Os fagos resultantes desta primeira seleção foram amplificados em *E. coli* XL1-Blue. Um segundo ciclo de seleção foi realizado como descrito acima.

#### 3.4.2. Extração do DNA plasmidial e transformação em *E. coli* TOP10

Bactérias *E. coli* XL1-Blue infectadas a partir do 2º ciclo de seleção foram utilizadas para extração do DNA plasmidial e posterior transformação em bactérias *E. coli* TOP10, uma linhagem não supressora. A extração DNA plasmidial foi realizada utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, DS, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado (*Nanodrop Spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e posteriormente analisado em gel de agarose a 0,8%.

Bactérias *E. coli* TOP10 foram preparadas com CaCl<sub>2</sub> para se tornarem quimiocompetentes. Aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial foram adicionados cuidadosamente em 10 µL bactérias TOP10. A mistura foi mantida em gelo durante 30 minutos e, em seguida, submetida a um choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 60 segundos em banho de gelo. Posteriormente, 800 µL de meio SOC foram adicionados e a suspensão foi incubada a 37°C por 45 minutos. Alíquotas das células transformadas foram semeadas em placas de ágar Luria-Bertani (LB) contendo carbenicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas, *overnight* a 37°C, para o crescimento das colônias recombinantes, que contêm o inserto.

### 3.4.3. Expressão de scFv

Cada colônia foi transferida e cultivada em uma placa *deep well* contendo 1 mL de meio *Superbroth* (SB), carbenicilina (100 µg/mL) e 2% de glicose 2M (v/v). A placa foi coberta com filme plástico e incubada *overnight* sob agitação a 250 rpm e 37°C. Foram transferidos 50 µL de cada clone bacteriano para uma nova placa contendo 1 mL de meio SB/carbenicilina (100 µg/mL)/2% de glicose 2M (v/v) e incubados a 250 rpm a 37°C durante 4,5 horas. Após a incubação a placa foi centrifugada a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C e o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de meio SB/carbenicilina (100 µg/mL). A expressão de scFv solúvel foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) a uma concentração final de 2,5 mM, *overnight* sob agitação a 250 rpm e 30°C. A placa *deep well* foi centrifugada a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o scFv solúvel foi transferido para outra placa de 96 poços e armazenado a 4°C. O volume remanescente da primeira placa foi centrifugado, e o *pellet* de bactérias foi utilizado para a extração do DNA e posterior sequenciamento.

### 3.4.4. Análise da expressão e especificidade dos clones de scFv por ELISA

Para análise de expressão de scFv, placas de microtitulação (Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foram sensibilizadas com as suspensões dos 96 clones de scFv em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6) e posteriormente bloqueadas. Para análise da especificidade dos clones de scFv, proteínas totais de *S. venezuelensis* foram sensibilizadas nas placas a 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6), bloqueadas e adicionadas da suspensão dos 96 clones de scFv. Em ambas placas, o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBST/BSA 5%. Adicionou-se 50 µL de anti-

HA/peroxidase (1:1000) (Roche, Basel, Suíça) diluído em PBS/BSA 5% e as reações foram reveladas pela adição do substrato a 0,012% (v/v) ( $H_2O_2$  a 30%) e cromógeno a 0,04% (p/v) ( $C_6H_4(NH_2)_2$ , orto-fenilenodiamina, OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) em tampão citrato fosfato (0,1M; pH 5,0) por 15 minutos. As etapas de bloqueio e conjugado foram realizadas a 37°C por 45 minutos e entre cada etapa realizou-se três lavagens com PBST por 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de  $H_2SO_4$  2N e a leitura realizada a 492 nm em leitora de ELISA Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Rockville, MD, EUA). Como controle negativo da especificidade, foi utilizado um clone de scFv irrelevante, selecionado frente à proteína recombinante do capsídeo do vírus suíno *Porcine circovirus 2*, utilizando a mesma biblioteca.

#### **3.4.5. Sequenciamento de DNA**

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *pellet* de bactérias previamente separado (item 3.4.3.). As reações foram realizadas de acordo com o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EUA). Foram utilizados os seguintes primers: MMB4 (5'- GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T-3') para a cadeia leve e MMB5 (5'-CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT C-3') para a cadeia pesada, em um volume final de 10  $\mu$ L. As amostras foram submetidas ao sequenciador MegaBace™ 1000 *Genetic Analyzer* (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA).

#### **3.4.6. Análise de bioinformática**

As sequências foram analisadas pelo IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) para identificação das cadeias leve e pesada das moléculas de scFv, assim como de suas regiões conservadas (*framework regions*, FRs) e variáveis (*complementarity determining regions*, CDRs). As sequências de aminoácidos deduzidas foram submetidas aos programas de bioinformática raptor-x (<http://raptorg.uchicago.edu/>) para obtenção da estrutura 3D da molécula de scFv, em formato pdb, e PyMOL (<http://www.pymol.org/>) para selecionar as regiões conservadas e variáveis do scFv.

### 3.5. Caracterização da proteína de *Strongyloides venezuelensis* na qual o scFv se liga por *pull-down assay*, imunofluorescência e espectrometria de massas

#### 3.5.1. Produção de clone de scFv em maior escala e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*, HPLC)

A expressão do clone de scFv foi induzida como descrito no item 3.4.3, para produção em maior escala (1000 mL). Após produção, o sobrenadante contendo o scFv foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, em sistema HPLC (AKTA<sup>TM</sup> purifier, GE Healthcare Life Sciences). Após imobilização de níquel na coluna e da adição de tampão de ligação (Imidazol 50mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4), adicionou-se o sobrenadante da cultura de bactérias, obtido após centrifugação e filtração. As moléculas de scFv ligadas ao níquel pela cauda de hexa-histidina (His<sub>6</sub>) foram eluídas por competição com tampão de eluição (Imidazol 500mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4). O scFv purificado foi concentrado utilizando tubo Amicon de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a concentração proteica foi determinada utilizando kit BCA<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

#### 3.5.2. *Dot blot* do scFv purificado

O ensaio *Dot blot* foi realizado adicionando-se 10 µL de scFv purificado a tiras de membrana de nitrocelulose 0,45 µM (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EUA). Após secagem a TA, a membrana foi bloqueada com PBS/BSA 5% por 1 hora a TA. Lavou-se a membrana três vezes em PBST. Adicionou-se anticorpo secundário anti-HA/peroxidase (Roche, Basel, Suíça), diluído a 1:1000 em PBS/BSA 5% e incubou-se por 1 hora a TA, sob agitação. Após lavagens com PBST, a reação foi revelada pela adição do substrato DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

### 3.5.3. Pull-down assay

Nesse ensaio utilizou-se *beads* anti-His (mAb Mag Beads, GenScript Transforming Biology Research, Piscataway, NJ, EUA), que possuem anticorpos anti-histidina acoplados na sua superfície capazes de se ligarem a cauda de histidina (His<sub>6</sub>) do scFv. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A 100 µL de *beads* foram adicionados 100 µL de scFv (100µg/mL) por 1 hora a TA em tampão de ligação/lavagem (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 0,15M, pH 7,4). Após lavagens sucessivas, foram adicionados 100 µL de proteínas totais de *S. venezuelensis* (1000 µg/mL) em tampão de ligação/lavagem e incubados por 1 hora a TA. Após três lavagens, adicionou-se 20 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM, pH6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%) e incubou-se a 100°C durante 5 minutos. Os ligantes foram eluídos das *beads* com a utilização de aparelho magnético *DynaMag-2* e o sobrenadante foi submetido em gel de SDS-PAGE 15%, em condições desnaturantes e não redutoras (LAEMMLI, 1970). As bandas proteicas foram visualizadas por coloração com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita por Friedman et al. (1982). A análise do gel foi realizada pelo programa Image J versão 1.44 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

### 3.5.4. Imunofluorescência (Immunofluorescence antibody test, IFAT)

Larvas L3 de *S. venezuelensis* foram adicionadas de *Tissue-Tek* (Tissue Freezing Medium, Durham, NC, EUA) e congeladas a -70°C. Seções de 2 µm de espessura foram cortadas utilizando criomicrótomo. Os cortes foram aderidos em lâmina de microscópio e mantidos 30 minutos a TA. Aos cortes foram adicionados 20 µL de scFv (750 µg/mL) e incubou-se a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo anti-HA/isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:1000) diluído em azul de Evans 2%, por 40 minutos a 37°C. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando glicerina/PBS (pH 9,0). As imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha). Cortes de metacestódeo de *Taenia solium* foram utilizados para controle negativo de marcação.

### 3.5.5. Espectrometria de Massas (CID-MS/MS)

Para espectrometria de massas realizou-se primeiramente uma hidrólise tripsínica da banda de interesse (~65kDa). A banda, previamente submetida ao gel de SDS-PAGE 15% e corada por Coomassie Blue coloidal 2% (Coomassie Blue G-250), foi cortada e submetida a lavagens sucessivas com acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 0,1M ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), até seu total descoramento. A banda foi lavada com acetonitrila pura e posteriormente seca em *Speed vac*. Adicionou-se sobre a banda 10  $\mu\text{L}$  de tripsina modificada (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (*sequencing grade*, Promega, Fitchburg, WI, EUA) em 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1M. Aguardou-se 15 minutos, adicionou-se  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1M em volume suficiente para cobrir a banda e incubou-se a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida com 5  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5% e a banda foi mantida a TA por 30 minutos para extração dos peptídeos. A solução, contendo os peptídeos, foi submetida à dessalinização utilizando ponteira *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico 0,2%. A amostra foi adicionada e dessalinizada três vezes com 100  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico a 0,2%. Os peptídeos foram eluídos da resina com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de metanol a 60% e ácido fórmico 5%. Nesse solvente a amostra foi submetida à análise em um espectrômetro de massas do tipo *eletrospray* triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, Reino Unido), para obtenção dos espectros CID-MS/MS (PRANCHEVICIUS et al., 2012).

### 3.5.6. Análise de bioinformática

As sequências dos fragmentos de peptídeos obtidos no item anterior foram submetidas e analisadas pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) em relação a sua similaridade com proteínas de *Strongyloides* sp. (taxid: 6247). Após a identificação da proteína com maior similaridade em relação ao *e-value*, a proteína foi submetida a programas de bioinformática. A estrutura 3D da proteína, em formato pdb, foi obtida pelo programa raptor-x (<http://raptorgx.uchicago.edu/>). Para a identificação das possíveis regiões de ligação entre a proteína e o scFv realizou-se um *docking* (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). Após seleção da estrutura proteína-scFv mais estável, suas regiões foram selecionadas e delimitadas com o auxílio do programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

### 3.6. Verificação da capacidade do scFv em detectar imunocomplexos por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), citometria de fluxo com *beads* epoxy e ressonância plasmônica de superfície

#### 3.6.1. Amostras de soro

*Pool* de soros humanos foram analisados e divididos em 3 grupos:

- *Pool 1* (P1): 10 µL de cada uma das 40 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado para estriñiloidíase;
- *Pool 2* (P2): 10 µL de cada uma das 44 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado para outras parasitoses;
- *Pool 3* (P3): 10 µL de cada uma das 40 amostras de soro de indivíduos saudáveis.

Todas as amostras de soro foram obtidas de indivíduos provenientes de áreas endêmicas para estriñiloidíase humana e submetidos a exames parasitológicos de fezes pelos métodos de Baermann (1919) e Lutz (1917), realizados com três amostras de cada indivíduo, para a identificação do parásito.

As metodologias a seguir foram realizadas em duplicata e correspondem às melhores condições de placas, *beads* e eletrodo, assim como as melhores diluições de scFv, soros e conjugados.

#### 3.6.2. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Placas de microtitulação de alta afinidade (Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foram incubadas com 50 µL de scFv (10 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,06 M (pH 9,6), *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBST e bloqueadas com PBST/BSA 5%. Adicionou-se 50 µL do *pool* de soros (1:50) e, posteriormente, 50 µL de anti-IgG humano/peroxidase (1:10.000), ambos diluídos em PBS/BSA 5%. As etapas de bloqueio, soro e conjugado foram realizadas a 37°C por 45 minutos e entre cada uma das etapas foram realizadas três lavagens com PBST por 5

minutos. A reação foi revelada pela adição de OPD 0,04% (p/v) em tampão citrato fosfato 0,1M (pH 5,0) e do substrato a 0,012% (v/v) ( $H_2O_2$  30%). As placas foram incubadas durante 15 minutos TA e a reação foi interrompida pela adição de 25  $\mu L$  de  $H_2SO_4$  2N. As densidades óticas foram obtidas a 492 nm em leitor de ELISA Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Rockville, MD, EUA).

### 3.6.3. Citometria de fluxo com *beads* epoxy

*Beads* epoxy magnéticos (Dynabeads M270 Epoxy, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram lavados três vezes em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) com o auxílio de um aparato magnético *DynaMag-2*. A 10  $\mu L$  de *beads* magnéticos ( $2 \times 10^7$  *beads*) adicionou-se 100  $\mu L$  de scFv (750  $\mu g/mL$ ) e solução de sulfato de amônio 3M/tampão fosfato 1,2M (pH 7,4) na proporção de 3:1 para acoplar as moléculas de scFv às *beads*. Incubou-se *overnight* a 4°C sob agitação. As *beads* foram bloqueadas com PBS/BSA 5%. Adicionou-se 100  $\mu L$  do *pool* de soros (1:50) e posteriormente 100  $\mu L$  de anti-IgG humano/FITC (1:200) diluídos em PBS/BSA 5%. As etapas de bloqueio e soro foram realizadas por 45 minutos a TA e entre todas as etapas foram realizadas três lavagens com PBST por 5 minutos. As *beads* (10.000 eventos/amostra) foram analisadas por citometria de fluxo (BM Accury<sup>TM</sup> C6, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) após prévia análise em microscópio de fluorescência (AMG EVOS fl, Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

### 3.6.4. Ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance, SPR*)

Um eletrodo de ouro foi preparado utilizando “solução piranha” que compreende uma solução de  $H_2SO_4$  PA e  $H_2O_2$  PA na proporção de 3:1, para retirada de possíveis contaminantes. Todas as etapas foram realizadas utilizando equipamento de ressonância plasmônica de superfície (Metrohm, Autolab B.V., Utrecht, Holanda). O eletrodo foi acoplado no equipamento e após duas lavagens em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), adicionou-se 100  $\mu L$  de scFv (10  $\mu g/mL$ ). O eletrodo foi bloqueado com caseína 1% e adicionou-se 100  $\mu L$  do *pool* de soros (1:10). Todo o processo foi realizado a temperatura de 35°C; as etapas de scFv, bloqueio e soro foram realizadas por 30 minutos e entre todas as etapas foram realizadas duas lavagens em tampão fosfato seguidas por 30 minutos em tampão fosfato até a obtenção da linha de base.

### 3.7. Determinação da acurácia diagnóstica do ELISA na detecção sorológica de imunocomplexos

#### 3.7.1. Amostras de soro

Amostras de soro de 124 indivíduos foram analisadas e divididas em 3 grupos:

- Grupo 1 (G1): 40 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado para estrongiloidíase;
- Grupo 2 (G2): 44 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado para outras parasitoses, sendo:
  - *Ascaris lumbricoides* ( $n = 8$ )
  - *Ancilostomídeos* ( $n = 7$ )
  - *Enterobius vermicularis* ( $n = 5$ )
  - *Trichuris trichiura* ( $n = 5$ )
  - *Schistosoma mansoni* ( $n = 4$ )
  - *Hymenolepis nana* ( $n = 4$ )
  - *Taenia* sp. ( $n = 6$ )
  - *Giardia lamblia* ( $n = 5$ )
- Grupo 3 (G3) : 40 amostras de soro de indivíduos saudáveis.

Todas as amostras de soro foram obtidas de indivíduos provenientes de áreas endêmicas para estrongiloidíase humana e submetidos a exames parasitológicos de fezes pelos métodos de Baermann (1919) e Lutz (1917), realizados com três amostras de cada indivíduo, para a identificação do parasito.

#### 3.7.2. ELISA

Placas de microtitulação de alta afinidade (Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foram incubadas com 50 µL de scFv (10 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,06 M (pH 9,6), *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBST e bloqueadas com PBST/BSA 5% por 45 minutos a 37°C. As

amostras de soro foram diluídas a 1:50 em PBST e adicionadas aos poços. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C. Após três lavagens com PBST por 5 minutos, adicionou-se anti-IgG humano/peroxidase (1:10000) diluído em PBS/BSA 5%. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C. Após três lavagens com PBST por 5 minutos, a reação foi revelada pela adição do orto-fenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 5,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. As placas foram incubadas por 15 minutos TA e a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. As densidades óticas foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Rockville, MD, EUA).

### 3.7.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Os melhores parâmetros de diagnóstico foram determinados pela *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC) e *receiver operating characteristic* (ROC) (GREINER et al., 1995).

O ótimo ponto de corte (*cut-off*) foi determinado pela TG-ROC. O índice de reatividade (IR) foi obtido através da fórmula: DO/*cut-off*. Valores de IR > 1 foram considerados positivos.

Os valores de sensibilidade (Se), especificidade (Es) e *likelihood ratio* + (LR+) ou razão de probabilidade positivo foram obtidos de acordo com Sopelete (2005), pelas fórmulas:

$$Se (\%) = VP \times 100 / (VP + FN); \quad (VP: \text{verdadeiro positivo}; FN: \text{falso negativo})$$

$$Es (\%) = VN \times 100 / (VN + FP); \quad (VN: \text{verdadeiro negativo}; FP: \text{falso positivo})$$

$$LR+ = Se / (1 - Es).$$

LR+ > 10 indica grande probabilidade de um indivíduo com estrongiloidíase ter um resultado positivo em relação a um indivíduo sem a parasitose (SOPELETE, 2005).

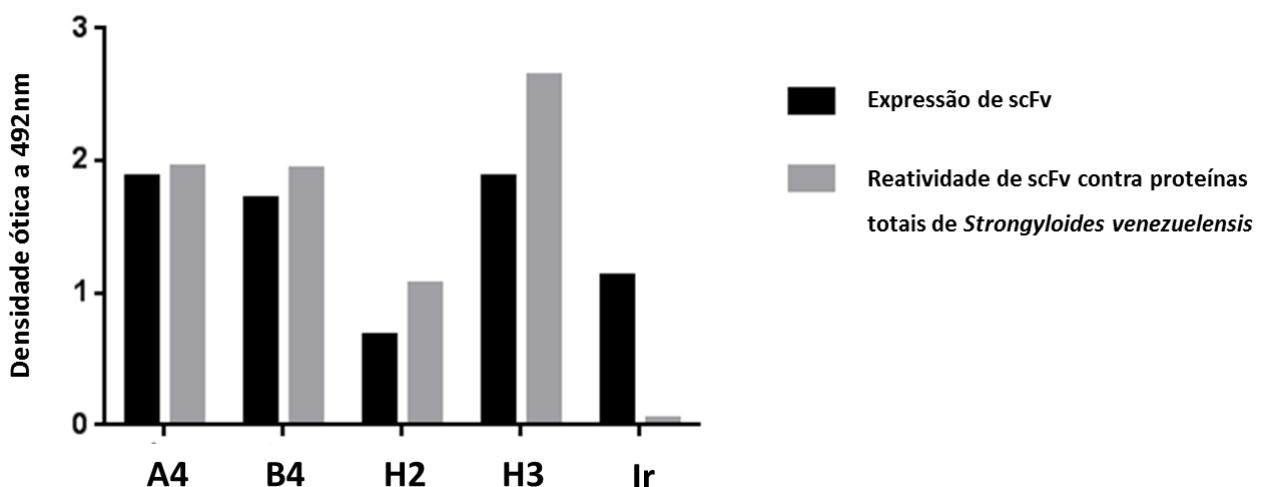
A acurácia diagnóstica do método foi determinada pela *area under ROC curve* (AUC) ou área sob a curva da curva ROC. Valores de AUC próximos a 1 indicam um teste eficiente; valores entre 0,7-0,9 indicam um teste moderadamente eficiente (SOPELETE, 2005).

Valores de *p*<0,05 foram considerados estatisticamente significantes e intervalos de confiança de 95% foram estabelecidos para os cálculos estatísticos de Se, Es e AUC.

## 4. RESULTADOS

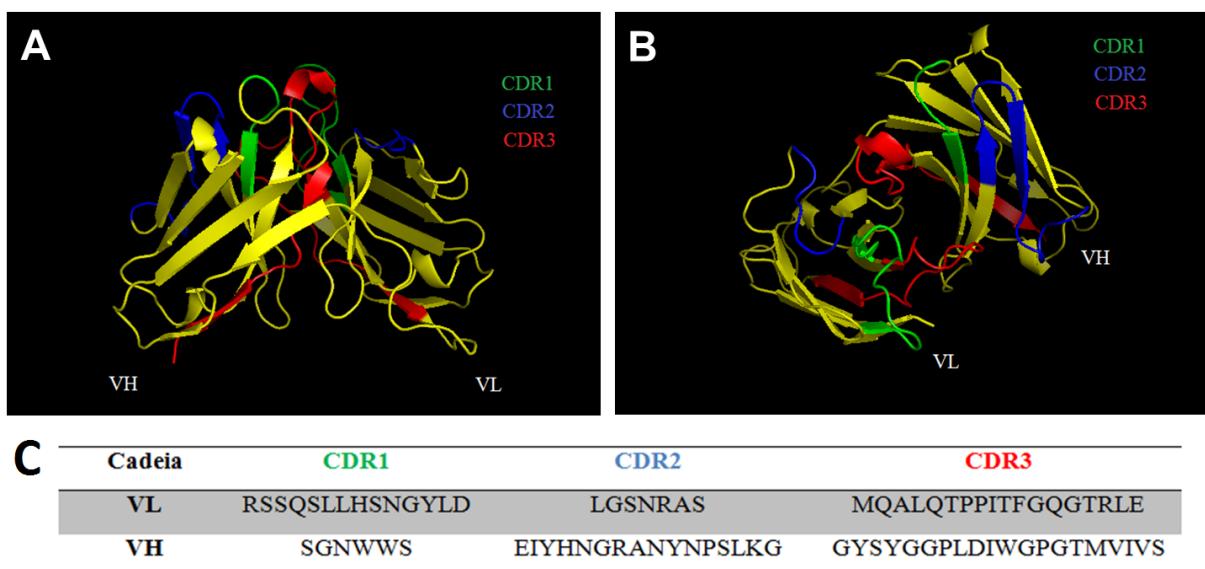
### 4.1. Seleção, sequenciamento de DNA, purificação por HPLC e *Dot blot* de scFv

Após dois ciclos de seleção verificou-se a eficiência do processo na seleção de clones de scFv específicos a proteínas totais de *S. venezuelensis*. Os resultados demonstraram que quatro, dos 96 clones analisados, expressaram scFv que se ligaram a proteínas totais *S. venezuelensis* por ELISA. Esses clones foram denominados A4, B4, H2 e H3 (Fig. 3).



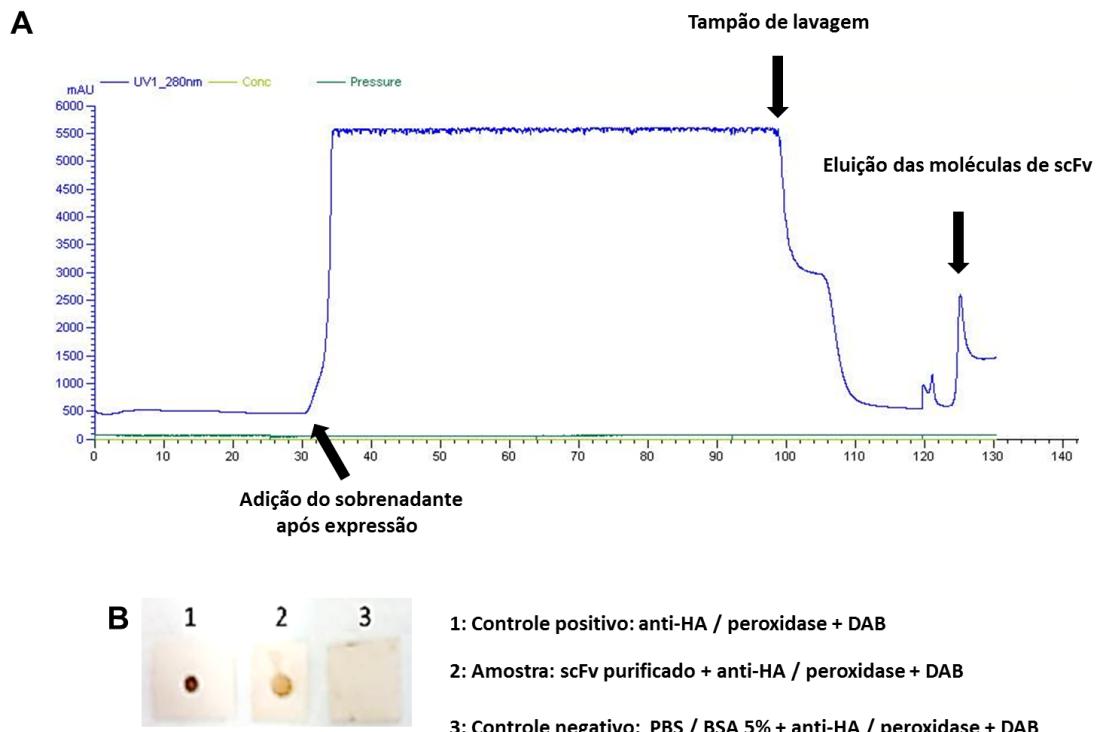
**Figura 3.** ELISA de expressão e reatividade a proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis* do sobrenadante de cultura dos clones induzidos por IPTG, após transformação em *E. coli* TOP 10. Dos 96 clones analisados, 4 (A4, B4, H2 e H3) foram expressos e reativos a proteínas totais do parasito. Ir: scFv irrelevante.

Para caracterização estrutural das moléculas de scFv selecionadas, as sequências de nucleotídeos obtidas pela reação de sequenciamento foram submetidas ao programa IgBLAST para a obtenção da sequência de aminoácidos e posterior identificação de moléculas de scFv por meio de suas cadeias leve (VL) e pesada (VH), bem como de suas regiões conservadas (FR1, FR2 e FR3) e variáveis (CDR1, CDR2 e CDR3). As análises demonstraram que os quatro clones apresentavam a mesma sequência de aminoácidos. Essa sequência foi submetida aos programas raptor-x e PyMOL para obtenção da estrutura 3D e seleção das regiões de CDR, respectivamente (Fig. 4A e B).



**Figura 4.** Estrutura 3D do scFv selecionado (A), analisada pelo programa PyMOL, e demonstração do sítio de ligação ao antígeno (B). CDR: regiões variáveis; VL e VH: cadeias leve e pesada, respectivamente. As sequências deduzidas de aminoácidos das regiões variáveis (CDR) podem ser visualizadas em (C).

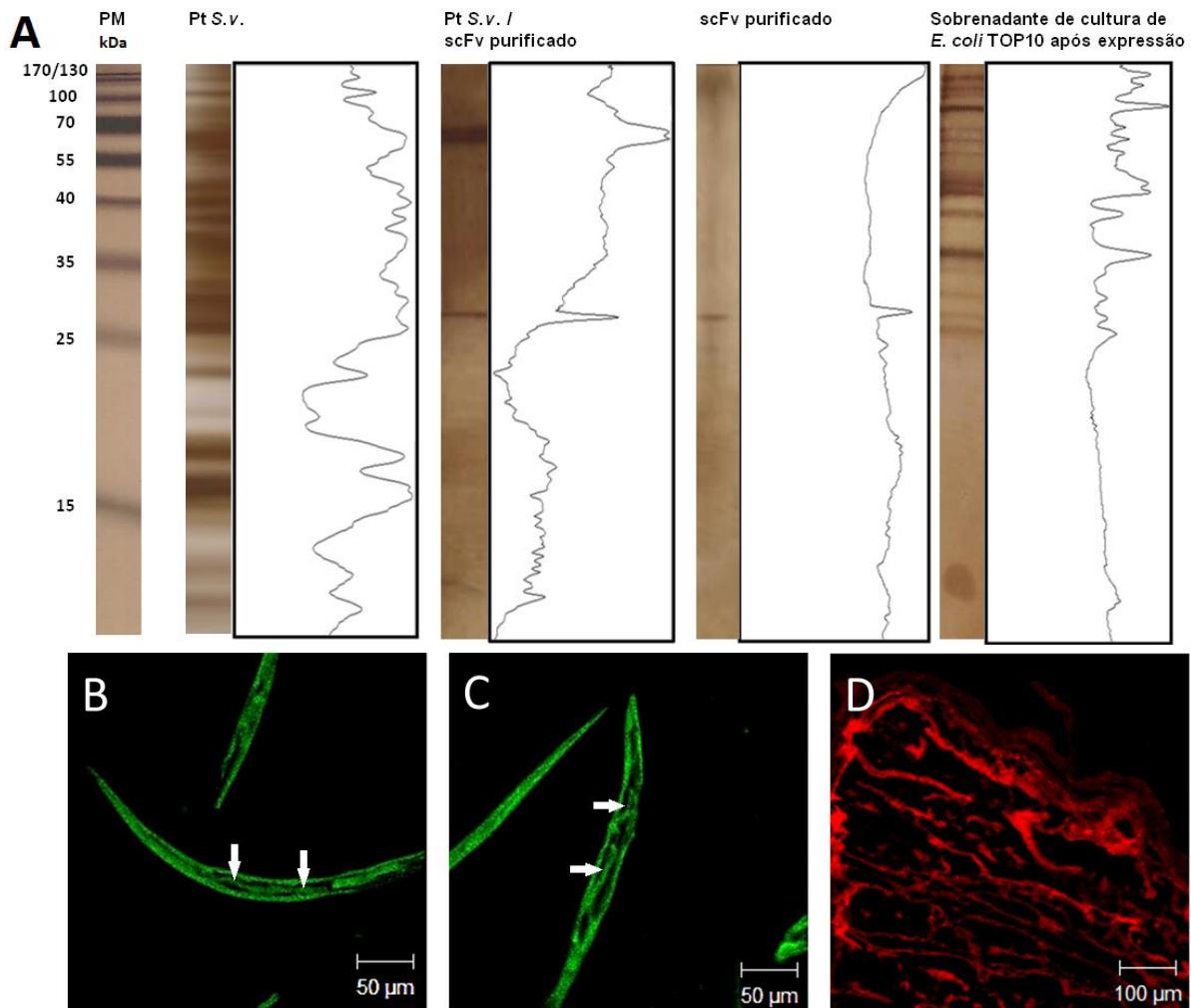
O clone selecionado foi submetido à produção em grande escala e ao processo de purificação em HPLC utilizando coluna His-Trap. Destaca-se o pico de eluição das moléculas de scFv (Fig. 5A). O eluado foi concentrado em tubos Amicon 10kDa e ao final do processo obteve-se 2 mL (750 µg/mL) de moléculas de scFv. O ensaio *dot blot* confirmou a expressão e eficiência do processo de purificação das moléculas de scFv (Fig. 5B).



**Figura 5.** Curva de purificação do sobrenadante de scFv por HPLC (A) e ensaio *dot blot* do scFv purificado (B).

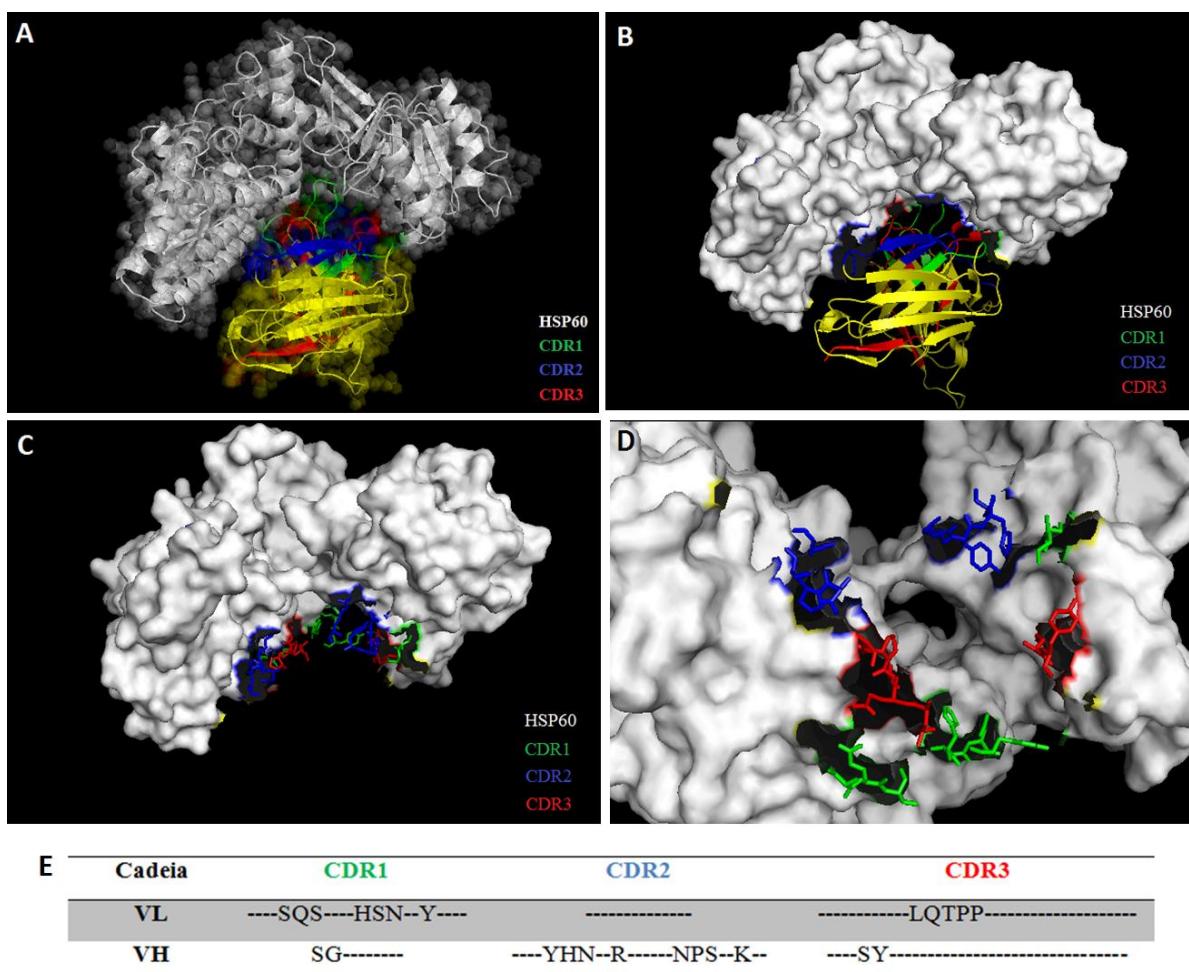
#### 4.2. Pull down assay, Imunofluorescência (Immunofluorescence antibody test, IFAT) e Espectrometria de Massas (CID-MS/MS)

Os ensaios *pull down*, IFAT e CID-MS/MS foram realizados para a identificação e caracterização da proteína do extrato total de *S. venezuelensis* na qual o scFv se ligou. O gel de SDS-PAGE 15% corado pelo nitrato de prata demonstrou, após *pull down assay*, que o scFv purificado (~29kDa) se ligou a uma fração antigênica de ~65kDa de *S. venezuelensis* (Fig. 6A), que está presente no corpo e sistema digestivo da larva infectante (L3), especificamente intestino (Fig. 6B) e esôfago (Fig. 6C), como demonstrado por IFAT. Metacestódeo de *Taenia solium* demonstrou ausência de marcação (Fig. 6D).



**Figura 6.** Identificação e caracterização da fração antigênica de *Strongyloides venezuelensis* na qual o scFv se ligou. Perfis eletroforéticos por SDS-PAGE 15% corado pelo nitrato de prata, após *pull down assay*, e analisados pelo programa Image J (A). Perfil de marcação do scFv no corpo e sistema digestivo, especificamente intestino (B - seta) e esôfago (C - seta), em larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* por imunofluorescência, utilizando conjugado anti-HA/FITC. Metacestódeo de *Taenia solium* foi utilizado para controle negativo de marcação (D). PM: padrão de peso molecular em kilodaltons (kDa); Pt S. v.: proteínas totais de *S. venezuelensis*.

A fração antigênica de ~65kDa foi corada com Coomassie coloidal, tripsinizada e caracterizada por espectrometria de massas (CID-MS/MS). Os resultados avaliados pelo BLAST demonstraram alta similaridade dessa fração antigênica com *heat shock protein 60* (HSP60) de *Strongyloides* sp. Foi realizado um *docking* da proteína em questão com a molécula de scFv para determinar possíveis regiões de ligação. O programa disponibilizou 10 possibilidades de ligação entre as duas moléculas em relação a sua maior estabilidade conformacional, ou seja, de menor entropia. A estrutura 3D de scFv/HSP60 de maior estabilidade foi submetida e analisada pelo programa PyMOL. Observou-se que as regiões de CDR, que são responsáveis pela ligação antígeno-anticorpo, estão fortemente associadas à molécula HSP60 (Fig. 7A, B e C) e uma análise no sítio de ligação demonstrou que somente a CDR2 da cadeia leve não possui aminoácidos ligantes à HSP60 (Fig. 7D). Destaca-se ainda que 25% das interações foram realizadas pelo aminoácido serina (S).

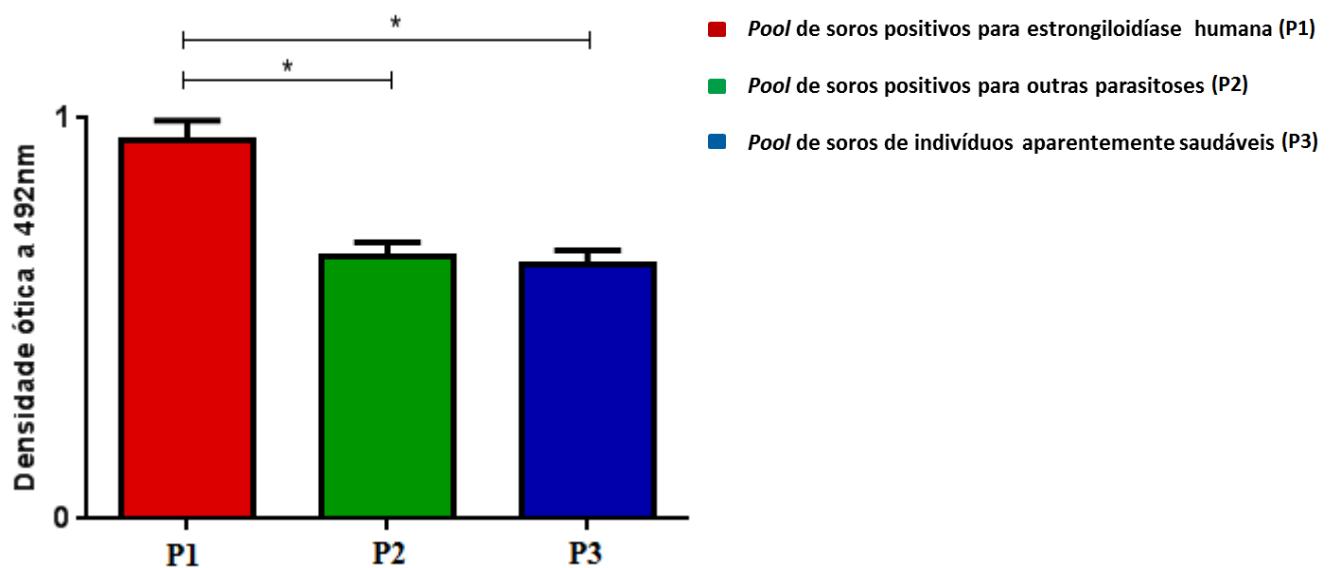


**Figura 7.** Estrutura 3D da interação scFv/HSP60 analisada pelo programa PyMOL. As estruturas demonstram as regiões de CDR do scFv associadas à HPS60 (A), a marcação dos locais de ligação do scFV à HSP60 (B) e interação dos aminoácidos das regiões de CDR à HSP60, de visualização frontal (C) e apical (D). Os aminoácidos das regiões variáveis (CDR) que se ligam à HSP60 podem ser visualizados em (E).

#### 4.3. ELISA, citometria de fluxo com *beads* epoxy e ressonância plasmônica de superfície (surface plasmon resonance, SPR)

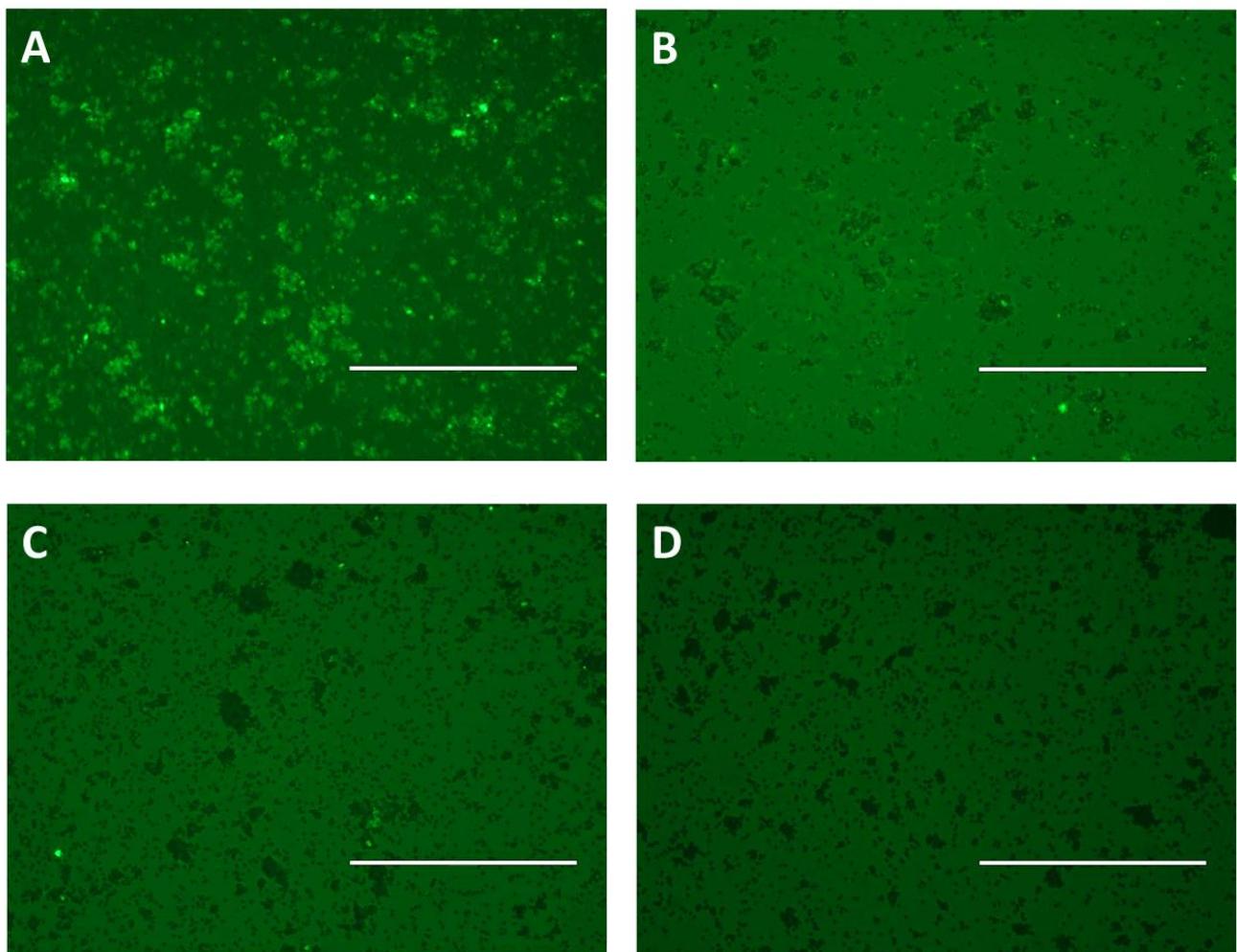
As metodologias de ELISA, citometria de fluxo com *beads* epoxy e SPR foram realizadas com o objetivo de verificar a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos positivos para estriñiloidíase e discriminar de *pool* de soros positivos para outras parasitoses e *pool* de soros de indivíduos saudáveis. O scFv demonstrou ser eficiente na detecção sorológica de imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos com estriñiloidíase, em relação às outras amostras de *pool*, utilizando as três metodologias.

Pelo método ELISA pôde-se verificar as diferenças nas densidades óticas (492 nm) ao se utilizar scFv sensibilizado em placas de microtitulação para detectar imunocomplexos em diferentes *pool* de soros (Fig. 8).



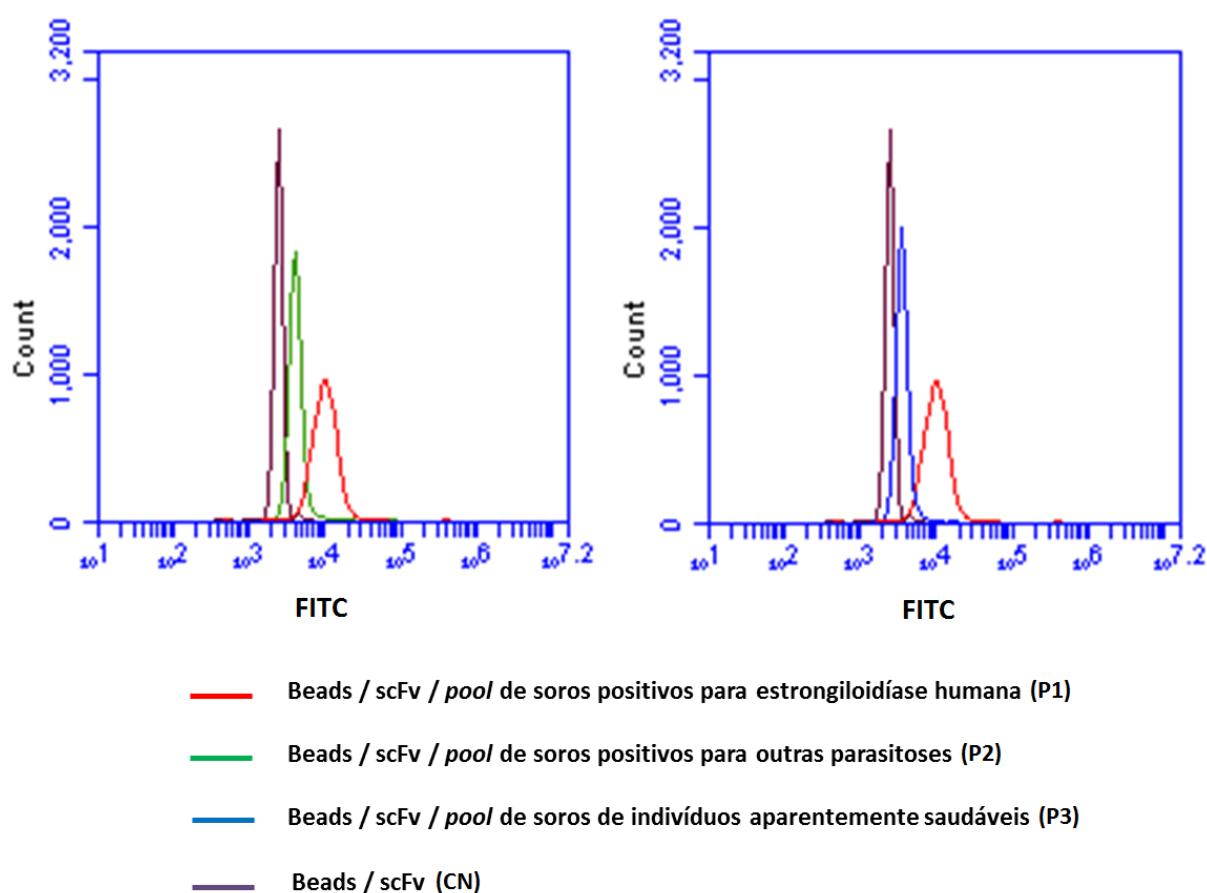
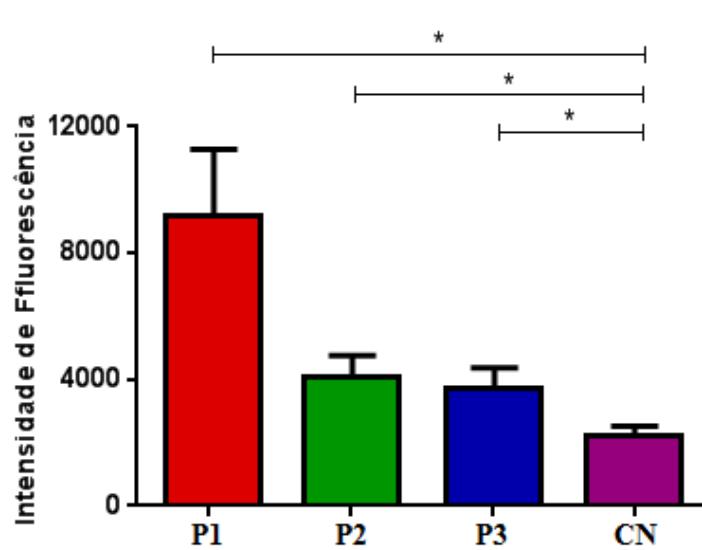
**Figura 8.** ELISA utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em *pool* de soros. A reação foi revelada com anti-IgG humana/peroxidase. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares.  $*p<0,05$ .

A citometria de fluxo foi precedida pela imunofluorescência das *beads*. Os resultados por microscopia de fluorescência possibilitaram visualizar a diferença de marcação das *beads* de acordo com o *pool* de soros utilizado: positivos para estrongiloidíase (Fig. 9A), positivos para outras parasitoses (Fig. 9B) e saudáveis (Fig. 9C). Como controle negativo foram utilizadas *beads* acopladas com scFv e adicionadas de anti-IgG humana/FITC (Fig. 9D).



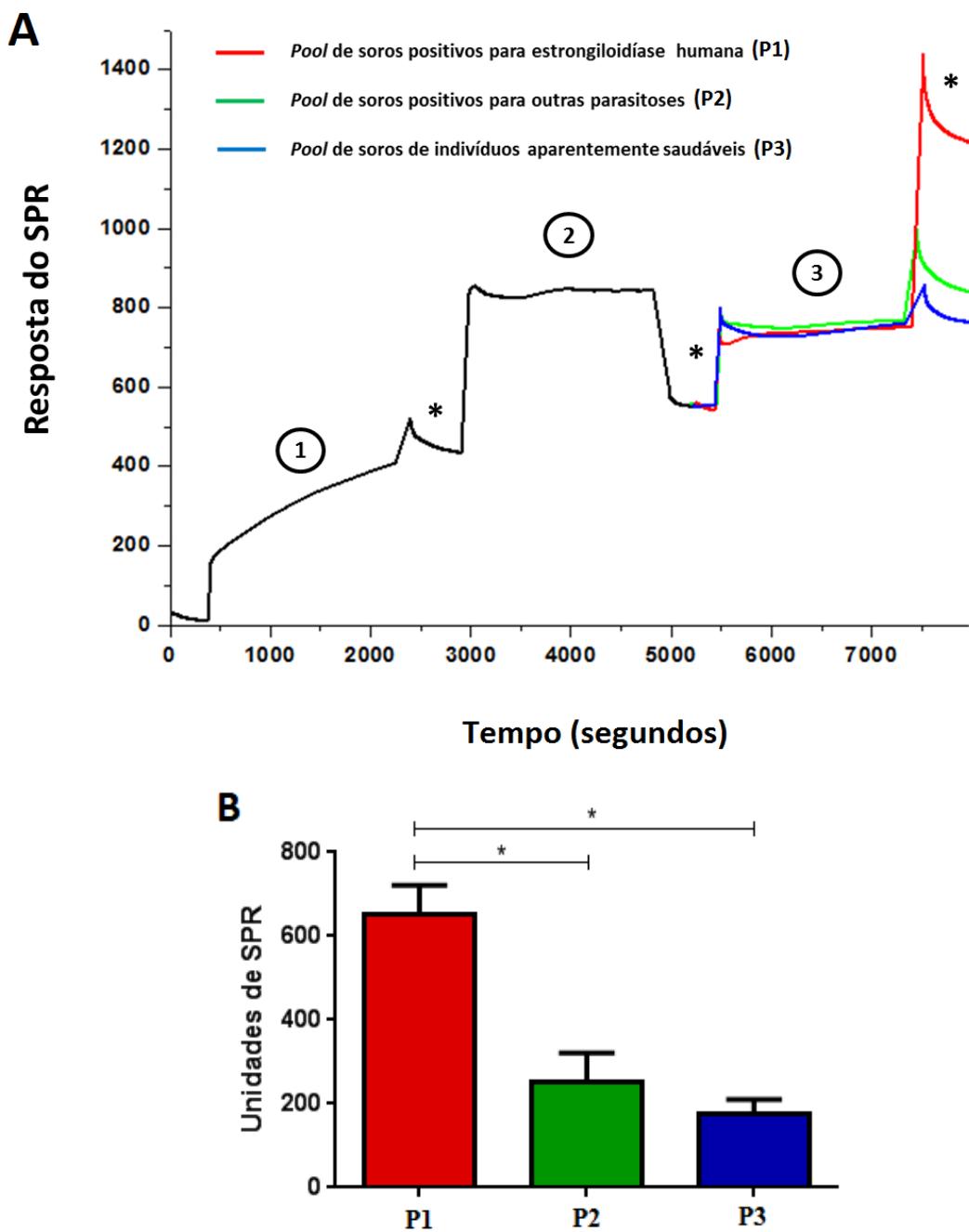
**Figura 9.** Detecção de imunocomplexos por imunofluorescência, utilizando *beads* epoxy previamente acoplados com scFv e *pool* de soros positivos para estrongiloidíase humana (A) e outras parasitoses (B) e *pool* de soros de indivíduos saudáveis (C), marcadas com anti-IgG humana/FITC. Como controle negativo foram utilizadas *beads* acopladas com scFv e adicionadas de anti-IgG humana/FITC (D). Barra: 200 $\mu$ m.

Posteriormente, esse resultado pode ser visualizado e confirmado por citometria de fluxo (Fig. 10A). Observa-se a diferença significativa na intensidade de fluorescência das *beads*, de acordo com o *pool* de soros utilizado (Fig. 10B).

**A****B**

**Figura 10.** Citometria de fluxo com *beads* previamente acopladas com scFv e adicionadas de *pool* de soros (A) e intensidade de fluorescência de cada ensaio (B). Marcação com anti-IgG humana/FITC. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. Count: contagem das *beads* (10.000 eventos); CN: controle negativo.  $*p<0,05$ .

Pela SPR pôde-se observar a eficiência de todo o processo: desde a imobilização do scFv ao eletrodo de ouro (1), bem como as etapas de bloqueio (2), adição de soros (3), lavagens (\*) (Fig. 11A). O resultado final do processo demonstra a diferença significativa na variação da resposta do SPR, de acordo com o *pool* de soros utilizado (Fig. 11B).



**Figura 11.** Ressonância plasmônica de superfície utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em *pool* de soros (A) e variação entre o resultado final e o início da imobilização de cada *pool* de soros (B). O eletrodo de ouro foi imobilizado com as moléculas de scFv (1), bloqueado com caseína 1% (2) e as amostras de *pool* de soros foram adicionadas (3). (\*) etapas de lavagens em tampão fosfato. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ) e são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares.  $*p<0,05$ .

As características gerais dos métodos utilizados e a análise do custo-benefício para validação da capacidade do scFv em detectar imunocomplexos utilizando 124 amostras de soro em duplicata, podem ser visualizadas nas Tabela 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Características gerais dos métodos para verificar a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos utilizando *pool* de soros.

	ELISA	Citometria de Fluxo	SPR
<b>Material para imobilização</b>	6 poços de 1 placa de microtitulação	60 $\mu$ L <i>beads</i> magnéticos ( $12 \times 10^7$ )	1 eletrodo de ouro
<b>Imobilização do scFv</b>	18 h	18 h	30 min
<b>Bloqueio</b>	45 min	45 min	30 min
<b>Amostras de soro</b>	45 min	45 min	30 min
<b>Conjugado</b>	45 min	45 min	NA
<b>Tempo total entre as etapas</b>	1 h	1 h	1 h e 30 min
<b>Tempo total sem imobilização</b>	3 h e 15 min	3 h e 15 min	2 h e 30 min
<b>Equipamento para análise</b>	Espectrofotômetro	Citômetro	SPR

NA: não se aplica; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; SPR: *surface plasmon resonance*.

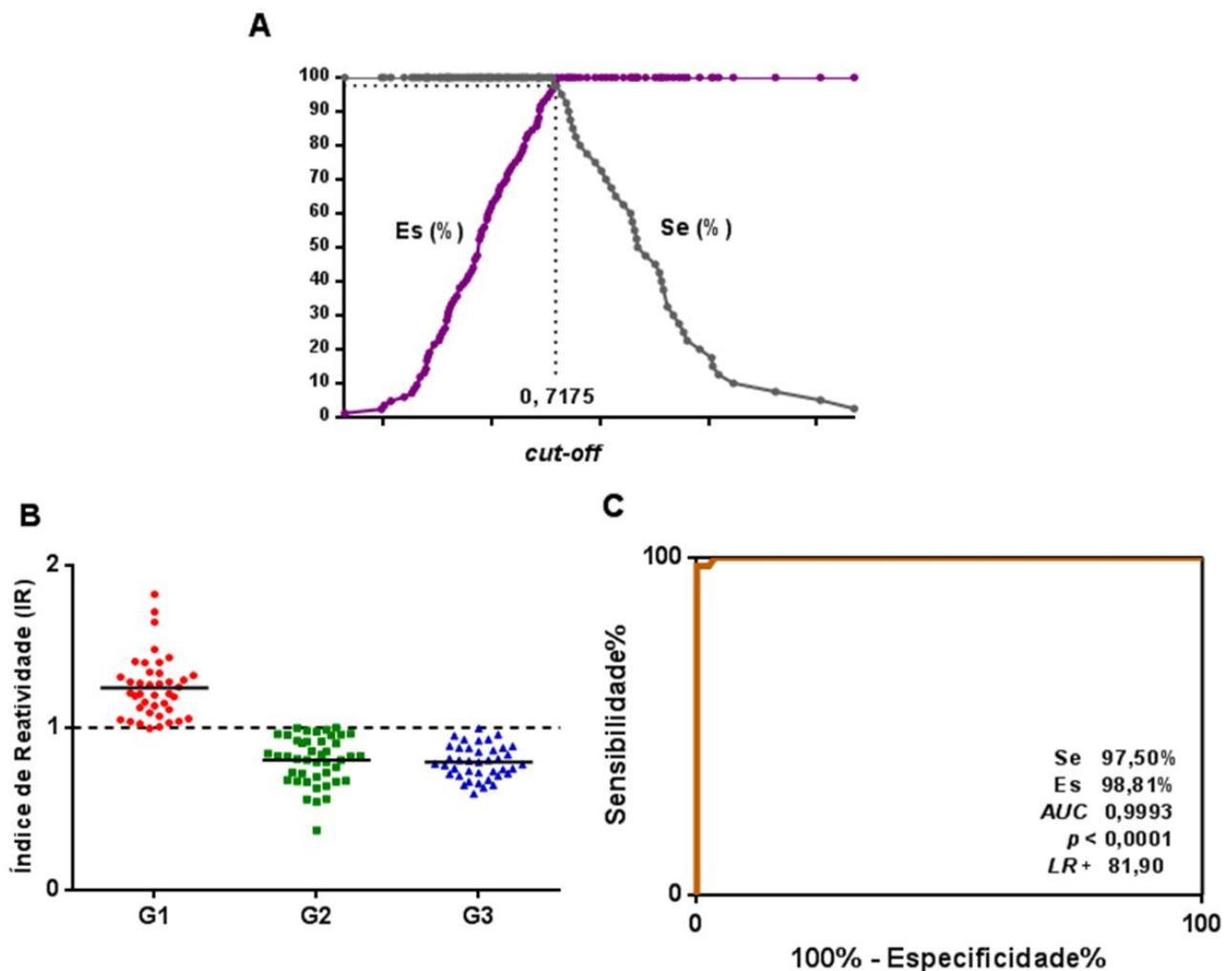
**Tabela 2.** Análise do custo-benefício dos métodos para validação do teste em duplicata, utilizando 124 amostras de soro.

	ELISA	Citometria de Fluxo	SPR
<b>Material para imobilização</b>	$\sim 2,5$ placas de microtitulação	$\sim 2,48 \times 10^{10}$ <i>beads</i>	$\sim 14$ eletrodos de ouro
<b>Custo de reagentes e equipamento</b>	$\sim \$15.000$	$\sim \$35.000$	$\sim \$200.000$
<b>Avaliação do custo-benefício</b>	Muito viável	Viável, se realizado em placa	Inviável

NA: não se aplica; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; SPR: *surface plasmon resonance*.

#### 4.4. ELISA com 124 amostras de soro

O scFv foi imobilizado em placas de microtitulação de alta afinidade para a detecção sorológica de imunocomplexos. Pela curva TG-ROC obteve-se o melhor ponto de corte do método (0,7175) (Fig. 12A). Os dados do índice de reatividade demonstraram a discriminação entre soros de indivíduos positivos para *S. stercoralis* (G1) em relação às amostras de soro de indivíduos positivos para outras parasitoses (G2) e saudáveis (G3) (Fig. 12B). Os resultados de sensibilidade e especificidade foram de 97,50% e 98,81%, respectivamente. O desempenho do teste foi demonstrado pelos resultados de AUC (0,9993) e LR+ (81,90) (Fig. 12C).



**Figura 12.** Método de ELISA utilizando scFv para detecção de imunocomplexos em amostras de soros. (A) TG-ROC indicando o ponto de corte do método (*cut-off*). (B) Índice de reatividade das amostras de soros de indivíduos com estrongiloidíase (G1;  $n=40$ ), com outras parasitoses (G2;  $n=44$ ) e saudáveis (G3;  $n=40$ ). (C) Curva ROC indicando sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de probabilidade positivo (*likelihood ratio +*; LR+). A linha tracejada indica o limiar do índice de reatividade.

## 5. DISCUSSÃO

A estrongiloidíase humana é uma condição negligenciada, pois apresenta dados de prevalência subestimados. Isso deve, principalmente, a dificuldades no diagnóstico parasitológico ocasionados pela liberação limitada e intermitente de larvas nas fezes, sendo necessário a coleta de até sete amostras para se ter um método de elevada sensibilidade. Essa falha no diagnóstico parasitológico pode resultar na manutenção do parasito por um longo período no corpo humano ou levar a complicações da doença como hiperinfecção e disseminação, particularmente em indivíduos imunocomprometidos ou submetidos a fatores imunossupressores (UPARANUKRAW et al., 1999; MARCOS et al., 2011, LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

Outras metodologias de diagnóstico vêm sendo descritas com o objetivo de detectar a infecção pelo parasito. A técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) tem apresentado elevada sensibilidade na detecção do DNA do parasito após processo de extração, utilizando fezes de indivíduos infectados. Entretanto, além do alto custo, há dificuldades inerentes à padronização da técnica. Como alternativa, os métodos imunológicos são aplicados rotineiramente devido à praticidade e disponibilidade dos reagentes. Além disso, possibilitam a verificação da resposta imune do hospedeiro, bem como sua aplicação em inquéritos soroepidemiológicos. A técnica de ELISA apresenta como vantagem em relação às outras técnicas imunológicas, a possibilidade de detecção de imunocomplexos circulantes, que é indicativo de infecção ativa (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). A detecção de imunocomplexos já havia sido empregada anteriormente para outras importantes infecções como toxoplasmose (CHAVES-BORGES et al., 1999), tuberculose (RAJA et al., 2004), leishmaniose (de CARVALHO et al., 2013) e dengue (EMMERICH et al., 2014).

A limitação na detecção da produção de larvas nas fezes, bem como a impossibilidade de manutenção do parasito *in vivo*, também dificulta a padronização de testes sorológicos que utilizem抗ígenos de larvas filarioídes de *S. stercoralis*. Desse modo, tornou-se conveniente a padronização e utilização de抗ígenos heterólogos de *S. cebus*, *S. ratti* e *S. venezuelensis*, devido à semelhança de moléculas imunogênicas importantes no imunodiagnóstico, como proteínas de excreção/secreção. Entretanto, apesar da elevada sensibilidade, um dos maiores problemas relatados no diagnóstico imunológico da estrongiloidíase humana se dá pela

frequente reação cruzada a outras infecções parasitárias, tornando-se fundamental a elaboração de métodos mais específicos (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

O desenvolvimento de sítios funcionais de anticorpos como scFv, que são fragmentos monoclonais de cadeia simples, permitiu a seleção de moléculas de scFv expressos na superfície de bacteriófagos, frente a vários抗ígenos de interesse. As bibliotecas de scFv consistem de vários domínios das cadeias leve e pesada, frequentemente fusionados à proteína PIII, presente no bacteriófago. Após o processo de seleção e infecção em *E. coli*, há produção de moléculas de scFv solúveis em grande escala, com relativa rapidez. Estes fragmentos de anticorpos podem representar uma ferramenta eficaz na elaboração de métodos de diagnósticos mais específicos, sem a necessidade da utilização da tecnologia de hibridoma (WEISSER; HAL, 2009).

Neste estudo, clones de scFv foram selecionados, a partir de uma biblioteca combinatorial, frente a proteínas totais de *S. venezuelensis* e posteriormente aplicados no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana. Os resultados do processo de *biopanning* demonstraram que esse processo foi eficiente, com a seleção de quatro clones específicos, que apresentaram a mesma sequência de aminoácidos, obtida após análise da reação de sequenciamento e submissão ao programa IgBLAST. As análises de bioinformática confirmaram a estrutura característica da molécula de scFv através da identificação das regiões variáveis (*complementarity determining regions*; CDRs) e conservadas (*framework regions*; FRs). Essas análises propiciaram ainda a caracterização estrutural e melhor observação do sítio de ligação ao抗ígeno, da molécula de scFv.

Para a identificação e caracterização da proteína de *S. venezuelensis*, na qual moléculas de scFv se ligam, foi realizado o *pull down assay*, seguido por SDS-PAGE 15%, ensaio de imunofluorescência e espectrometria de massas. O gel de SDS-PAGE demonstrou que as moléculas de scFv foram capazes de se ligar a uma fração antigênica de ~65kDa, a partir do extrato total de *S. venezuelensis*, confirmando sua reatividade. A capacidade de ligação das moléculas de scFv a essa proteína foi confirmado por IFAT, pois moléculas de scFv se ligaram em regiões do corpo e ao sistema digestivo da larva infectante, demonstrando sua funcionalidade. Além disso, as moléculas de scFv não se ligaram à抗ígenos da forma metacestódea de *T. solium*, indicando sua especificidade.

Os resultados de espectrometria de massas da fração antigênica de ~65kDa demonstrou alta similaridade dessa fração a *heat shock protein 60* (HSP60) de *Strongyloides* sp., uma proteína de 64kDa, mitocondrial e citoplasmática, com atividade de ligação ao ATP.

Além da função original da HSP60 como chaperona, acredita-se que essa proteína apresenta-se fortemente associada à relação parasito-hospedeiro, uma vez que compreende um dos importantes componentes de proteínas excretadas e secretadas (*excreted/secreted proteins, ESPs*) pelo parasito (TAZIR, 2009). Anticorpos IgM produzidos frente à proteína recombinante de HSP60 de *S. ratti* já foram utilizados para fins imunoterapêuticos, em modelos experimentais, demonstrando o potencial impacto da HSP60 na resposta imune do hospedeiro (NOUIR et al., 2012). Uma análise no sítio de ligação da molécula de scFv à HSP60 demonstrou que 25% das ligações foram realizadas pelo aminoácido serina. Birtalan et al. (2008) demonstraram que regiões variáveis ricas nos aminoácidos tirosina e serina podem apresentar elevada afinidade e especificidade ao alvo.

A capacidade do scFv em detectar imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos com estrengiloidíase foi verificada por ELISA, citometria de fluxo com *beads* epoxy e ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance, SPR*). Pelas três técnicas as moléculas de scFv foram capazes de detectar imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos com estrengiloidíase e discriminá-los de *pool* de soro de indivíduos com outras parasitoses e saudáveis. Pelo método de ELISA as moléculas de scFv foram sensibilizadas em placas de microtitulação. A citometria de fluxo utilizando *beads* epoxy compreendeu um método “dois em um”, uma vez que sua realização foi precedida pela análise das *beads* em microscópio de fluorescência, o que propiciou uma prévia do resultado, de acordo com a diferença de fluorescência das *beads* e o *pool* de soros utilizado. A técnica de SPR proporcionou a visualização em tempo real e demonstrou a eficiência de todas as etapas do processo, desde a imobilização do scFv ao eletrodo de ouro, bloqueio, adição de amostras, etapas de lavagem e o resultado final, confirmando os resultados dos outros dois métodos; além disso, ao contrário das outras técnicas, pela SPR não há necessidade de utilização de anticorpos de detecção, podendo ser denominada de *label-free*.

A técnica de ELISA havia sido descrita para detecção de imunocomplexos, na estrengiloidíase humana, entretanto utilizando um anticorpo policlonal produzido em modelo experimental (GONÇALVES et al., 2012). Por sua vez, não existem dados na literatura que demonstram a utilização da citometria de fluxo com *beads* epoxy para fins diagnósticos. Entretanto, um método que utiliza *beads* acoplados com proteína A/G denominado de LIPS, que analisa os resultados em luminômetro, já foi aplicado na detecção de anticorpos em soro de indivíduos com estrengiloidíase e demonstrou elevada eficácia (RAMANATHAN et al., 2008; KROLEWIECKI et al., 2010). A técnica de SPR nunca havia sido empregada para o

diagnóstico da estrongiloidíase humana ou para a detecção de imunocomplexos. Um estudo realizado recentemente demonstrou que essa técnica apresentou elevada eficácia na detecção sorológica de anticorpos IgM em indivíduos infectados pelo vírus da dengue (JAHANSHANI et al., 2014).

A análise geral dos métodos demonstrou que a técnica de SPR foi a que demandou menos tempo (2h e 30min). As técnicas de citometria de fluxo com *beads* epoxy e ELISA demandaram mais tempo para sua realização (3h e 15 min). Além disso, deve-se considerar que nessas duas metodologias houve necessidade de imobilização das moléculas de scFv por 18 horas. Desse modo, a técnica de SPR, como método de diagnóstico para poucas amostras, apresenta como vantagens o tempo e a praticidade. Entretanto, para a validação do método utilizando 124 amostras de soro, a análise do custo-benefício demonstrou que a técnica de SPR é inviável pelo custo dos eletrodos de ouro. A citometria de fluxo com *beads* epoxy poderia ser viável se realizada em placa, o que não foi possível uma vez que o equipamento não possuía suporte para placas. O método de ELISA demonstrou-se extremamente viável uma vez possibilitou a realização do teste em duplicata, utilizando apenas 2,5 placas. Essas características são importantes e devem ser analisadas para a escolha de um método de diagnóstico de acordo com a demanda e os recursos tecnológicos disponíveis em cada região.

Esse estudo foi realizado com o intuito de desenvolver uma estratégia de diagnóstico e os resultados demonstraram uma elevada eficiência de diagnóstico do ELISA, utilizando fragmentos de anticorpos (scFv) para a detecção de imunocomplexos em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase. Esta detecção é muito importante e útil para o diagnóstico sorológico de estrongiloidíase humana em relação aos métodos que se baseiam na detecção de anticorpos, porque os resultados positivos são indicativos de infecção, independentemente do título de anticorpos no soro. Pela curva TG-ROC obteve-se o melhor ponto de corte para o método. Os resultados demonstraram valores de sensibilidade e especificidade superiores a 97%. O resultado de LR+ (*likelihood* +; razão de probabilidade positivo) demonstrou que o método é capaz de detectar um resultado positivo para estrongiloidíase humana e diferenciar de amostras de soro de indivíduos sem a parasitose. Apenas um resultado falso positivo foi observado em um indivíduo positivo para *Ascaris lumbricoides*, indicando uma possível reação cruzada, no entanto, o índice de reatividade dos outros sete indivíduos positivos para *A. lumbricoides* foi menor que 1, podendo indicar uma possível co-infecção de ascaridíase e estrongiloidíase não detectada pelo exame parasitológico. O resultado de AUC apresentou um valor próximo ao valor máximo, conferindo ao método uma excelente acurácia diagnóstica.

Na literatura, existem até agora poucos estudos que empregam scFv no diagnóstico de doenças parasitárias. Os artigos mais recentes demonstraram sua importante aplicabilidade na detecção de componentes antigênicos de superfície de *S. mansoni* (SEPULVEDA et al., 2010) e na seleção de抗ígenos para o diagnóstico da neurocisticercose (RIBEIRO et al., 2013). Além disso, existe apenas um estudo que realizou a detecção de imunocomplexos em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase por ELISA, no qual foram obtidos índices de sensibilidade de 93,3% e especificidade de 86,1% (GONÇALVES et al., 2012). No entanto, ao contrário do estudo citado, o presente estudo utiliza uma metodologia que permitiu a produção *in vitro* de fragmentos de anticorpos monoclonais com elevada afinidade à molécula alvo e, consequentemente, não se utiliza de modelos animais para a sua síntese, reduzindo drasticamente o tempo necessário para sua obtenção.

Este foi o primeiro estudo que utilizou scFv no diagnóstico da estrongiloidíase humana. O método demonstrou ser eficiente na detecção de imunocomplexos em amostras de soro, além de representar uma importante metodologia de diagnóstico, uma vez que a detecção de imunocomplexos é um indicativo de infecção ativa. O desenvolvimento de um teste de diagnóstico para a estrongiloidíase humana, inovador e com elevada acurácia, é de grande importância para a saúde pública, principalmente devido à possibilidade de cronificação e hiperinfecção, que pode levar a quadros graves, potencialmente fatais.

## 6. CONCLUSÕES

- Nesse estudo a tecnologia de *Phage Display* foi eficaz na seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv) frente a proteínas totais de *Strongyloides venezuelensis*;
- Análises por *pull down assay*, imunofluorescência e espectrometria de massa auxiliaram na identificação da proteína HSP60 (*heat shock protein 60*) de *S. venezuelensis*, na qual o scFv se liga, demonstrando a especificidade desse fragmento de anticorpo;
- Ensaios de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), citometria de fluxo com *beads* epoxy e ressonância plasmônica de superfície demonstraram a capacidade do scFv em detectar imunocomplexos em *pool* de soros de indivíduos com estrongiloidíase e diferenciar de *pool* de soros de indivíduos com outras parasitoses e indivíduos saudáveis;
- O ELISA apresentou elevada acurácia diagnóstica na utilização de scFv para detecção de imunocomplexos em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase humana, representando uma metodologia nova e eficaz no imunodiagnóstico dessa parasitose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

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

ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Japanese Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 1, p. 11-17, 1988.

ARAÚJO, T. G. P.; PAIVA, C. E.; ROCHA, R. M.; MAIA, Y. C.; SENA, A. A.; UEIRAVIEIRA, C.; CARNEIRO, A. P.; ALMEIDA, J. F.; de FARIA, P. R.; SANTOS, D. W.; CALÁBRIA, L.; ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, S. A.; GOULART. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. **Cancer letter**, v. 343, p. 275-285, 2014.

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

BARBAS III, C.F., BURTON, D.R., SCOTT, J.K., SILVERMAM, G.J. **Phage display: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 8.4-8.7, 2001.

BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillula intestinalis*) nouveau ver nûmatoïde trouvé par le Dr. Normand chez les náades atteints de diarréa de Cochinchine. **Compose Rend Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.

---

<sup>1</sup> Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descritas em: SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normalização de trabalhos técnicos científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses**. 4<sup>a</sup> ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 163p.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 1-33, 2001.

BIRD, R. E.; HARDMAN, K. D.; JACOBSEN, J. W.; JOHNSON, S.; KAUFMAN, B. M.; LEE, S. M.; LEE, T.; POPE, S. H.; RIORDAN, G. S.; WHITLOW, M. Single-chain antigen-binding proteins. **Science**, v. 242, p. 426-432, 1988.

BIRTALAN, S.; ZHANG, Y.; FELLOUSE, F. A.; SHAO, L.; SCHAEFER, G.; SIDHU, S. S. The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, p. 1518-1528, 2008.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A. J.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; CHIODINI, P. L.; ANSELMI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9: e2514, 2013.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R. O.; KROLEWIECKI, A. J.; ALBONICO, M.; GOBBO, M.; BONAFINI, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T. B. Diagnostic accuracy of the five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2640, 2014.

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BUONFRATE, D.; REQUENA-MENDEZ, A.; ANGHEBEN, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; VAN DEN ENDE, J.; BISOFFI. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 78-88, 2013.

BUONFRATE, D.; MENA, M. A.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; ALBONICO, M.; GOTUZZO, E.; BISOFFI, Z. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. **Epidemiology and Infection**, doi:10.1017/S0950268814001563, 2014.

CARNEIRO, A. P.; REIS, C. F.; MORARI, E. C.; MAIA, Y. C.; NASCIMENTO, R.; BONATTO, J. M.; de SOUZA, M. A.; GOULART, L. R.; WARD, L. S. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. **British Journal of Cancer**, v. 111, p. 551-558, 2014.

CHAVES-BORGES, F. A.; SOUZA, M. A.; SILVA, D. A.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1 (p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 329-338, 1999.

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

de CARVALHO, C. A.; PARTATA, A. K.; HIRAMOTO, R. M.; BORBOREMA, S. E.; MEIRELES, L R.; NASCIMENTO, N. D.; de ANDRADE, H. F. A simple imune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. **Acta Tropica**, v. 125, p. 128-136, 2013.

EMMERICH, P.; MIKA, A.; SCHMITZ, H. Detection of serotype-specific antibodies to the four dengue viruses using an immune complex binding (ICB) ELISA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2580, 2014.

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

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

FELICIANO, N.D.; RIBEIRO, V.S.; SANTOS, F.A.A.; FUJIMURA, P.T.; GONZAGA, H.T.; GOULART, L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e2792, 2014.

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

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

GONÇALVES, A. L. R.; NUNES, D. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 139, p. 956-961, 2012.

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

GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, p. 123-132, 1995.

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

HUANG, J. X; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses and parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4569-4582, 2012.

HUSTON, J. S.; LEVINSON, D.; MUDGETT-HUNTER, M.; TAI, M. S.; NOVOTNY, J.; MARGOLIES, M. N.; RIDGE, R. J.; BRUCCOLERI, R. E.; HABERT, E.; CREA, R.; OPPERMANN, H. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 5879-5883, 1988.

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

IORI, A. P.; FERRETTI, A.; GENTILE, G.; GABRIELLI, S.; PERRONE, S.; BARCERI, W.; TORELLI, G. F.; NATALINO, F.; SCALZULLI, E.; TOTINO, V.; FOÀ, R.; CANCRINI, G.; GIRMENIA, C. *Strongyloides stercoralis* infection in allogeneic stem cell transplant: a case report and review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, doi: 10.1111/tid.12239, 2014.

IZQUIERDO, I.; BRIONES, J.; LLUCH, R.; ARQUEROS, C.; MARTINO, R. Fatal *Strongyloides* hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature. **Case Reports in Hematology**, 860976, 2013.

JAHANSHANI, P., ZALNEZHAD, E., SEKARAN, D.S., ADIKAN, F.R.M. Rapid immunoglobulin M-based dengue diagnostic test using surface plasmon resonance biosensor. **Scientific Reports**, v. 4, e3851, 2014.

JANKOVIC D, STEINFELDER S, KULLBERG M, SHER A. Mechanisms underlying helminth-induced Th2 polarization: default, negative or positive pathways? **Chemical Immunology and Allergy**, v. 90, p. 65-81, 2006.

JUCHEMS, M. S.; NIESS, J. H.; LEDER, G.; BARTH, T. F.; ADLER, G.; BRAMBS, H. J.; WAGNER, M. *Strongyloides stercoralis*: a rare cause of obstructive duodenal stenosis. **Digestion**, v. 77, p. 141-144, 2008.

KNOPP, S.; MGENI, A. F.; KHAMIS, I. S.; STEINMANN, P.; STOTHARD, J. R.; ROLLINSON, D.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, e331, 2008.

KNOPP, S.; SALIM, N.; SCHINDLER, T.; VOULES, D. A. K.; ROTHEN, J.; LWENO, O.; MOHAMMED, A. S.; SINGO, R.; BENNINGHOFF, M.; NSOJO, A. A.; DAUBENBERGER, C. Diagnostic accuracy of Kato-Katz, Flotac, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 535-545, 2014.

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

KRETZSCHMAR, T.; VON RUDEN, T. Antibody discovery: phage display. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 598-602, 2002.

KROEWIECKI, A. J.; RAMANATHAN, R.; FINK, V.; MCAULIFFE, I.; CAJAL, S. P.; WON, K.; JUAREZ, M.; DI PAOLO, A.; TAPIA, L.; ACOSTA, N.; LEE, R.; LAMMIE, P.; ABRAHAM, D.; NUTMAN, T. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in Northern Argentina. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, p.1624-1630, 2010.

KUNST, H.; MACK, D.; KON, O. M.; BANERJEE, A. K.; CHIODINI, P.; GRANT, A. Parasitic infectious of the lung: a guide for the respiratory physician. **Thorax**, v. 66, 528-536, 2011.

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

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

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

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

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 156-161, 1998.

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

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

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

MARCILLA, A.; GARG, G.; BERNAL, D.; RANGANATHAN, S.; FORMENT, J.; ORTIZ, J.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; DOMINGUEZ, M. V.; PEDROLA, L.; MARTINEZ-BLANCH, J.; SOTILLO, J.; TRELIS, M.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1513, 2012.

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

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, p. 35-46, 2011.

McCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G.; CHISWELL, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552-554, 1990.

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

MESTECKY, J.; RUSSEL, M. W. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. **Immunology Letters**, v. 124, p. 57-62, 2009.

MIRDHA, B. R. Human strongyloidiasis: often brushed under the carpet. **Tropical Gastroenterology**, v. 30, p. 1-4, 2009.

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

NAVES, M. M.; COSTA-CRUZ, J. M. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among the elderly in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, v. 55, p. 309-313, 2013.

NOUIR, N. B.; PIÉDAVENT, M.; OSTERLOH, A.; BRELOER, M. Passive immunization with a monoclonal IgM antibody specific for *Strongyloides ratti* HSP60 protects mice against challenge infection. **Vaccine**, v. 30, p. 4971-4976, 2012.

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

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

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

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

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

PRANCHEVICIUS, M. C.; OLIVEIRA, L. L; ROSA, J. C; AVANCI, N. C.; QUIAPIM, A. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GOLDMAN, M. H. S. Characterization and optimization of Artin M lectin expression in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 12, p. 44-53, 2012.

RAJA, A.; UMA DEVI, K. R.; RAMALINGAM, B.; BRENNAN, P. J. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex-bound anti-30kDa antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 253-259, 2004.

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

RAMÍREZ-OLIVENCIA, G.; ESPINOSA, M. Á. C.; MARTÍN, A. B.; NÚÑEZ, N. I.; de las PARRAS, E. R.; NÚÑEZ, M. L.; PUENTE, S. P. Imported strongyloidiasis in Spain. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 32-37, 2014.

RETS, A.; GUPTA, R.; HASEEB, M. A. Determinants of reactivation of inapparent *Strongyloides stercoralis* infection in patients hospitalized for unrelated admitting diagnosis. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, p. 1279-1285, 2013.

RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; COSTA, I. N.; GONÇALVES-PIRES M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology Letters**, v. 134, p. 69-74, 2010.

RIBEIRO, V. da S.; ARAÚJO, T.G.; GONZAGA, H.T.; NASCIMENTO, R.; GOULART L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. **Immunology Letters**, v. 156, p. 59-67, 2013.

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

RODRIGUES, R. M.; CARDOSO, C. R.; GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, N. M.; MASSA, V.; ALVES, R.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Increased susceptibility to *Strongyloides stercoralis* infection is related to the parasite load and absence of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 580-586, 2013.

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

SANTOS, P. S.; SENA, A. A.; NASCIMENTO, R.; ARAÚJO, T. G.; MENDES, M. M.; MARTINS, J. R.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; GOULART, L. R. Epitope-based vaccines with the *Anaplasma marginale* MSP1a functional motif induce a balanced humoral and cellular immune response in mice. **PLoS One**, v. 8, e60311, 2013.

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5: e2288, 2013.

SEPULVEDA, J.; TREMBLAY, J.M.; DEGNORE, J.P.; SKELLY, P.J.; SHOEMAKER, C.B. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1407-1417, 2010.

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

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

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, J.; KONTERMANN, R. E.; EMBLETON, J.; KUMAR, S. Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 331-341, 2005.

SOPELETE, M. C. Métodos de análise em estudo sobre diagnóstico. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**, 1 ed., Uberlândia: EDUFU, p. 215-238, 2005.

TAZIR, Y. *Strongyloides ratti: identification, isolation and characterization of heat shock protein 10 and heat shock protein 60*. 1<sup>a</sup> ed. Giessen: VVB Laufersweiler Verlag, 2009. 129p.

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

VAUGHAN, T. J.; WILLIAMS, A. J.; PRITCHARD, K.; OSBOURN, J. K.; POPE, A. R.; EARNSHAW, J. C.; McCAFFERTH, J.; HODITS, R. A.; WILTON, J.; JOHNSON, K. S. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 309-314, 1996.

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. 342-346, 2009.

VINEY, M. E.; ASHFORD, R. W.; BARNISH, G. A taxonomic study of *Strongyloides草*, 1879 (Nematoda) with special reference to *Strongyloides fuelleborni* von Linstow, 1905 in man in Papua New Guinea and the description of a new subspecies. **Systematic Parasitology**, v. 18, p. 95-109, 1991.

WEISSER, N. E.; HAL, C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 502-520, 2009.

YOSHIDA, A.; NAGAYASU, E.; NISHIMAKI, A.; SAWAGUSHI, A.; YANAGAWA, S.; MARUYAMA, H. Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology International**, v. 60, p. 75-83, 2011.