

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**FRACIONAMENTO, DEGLICOSILAÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
PARCIAL E IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Strongyloides*
venezuelensis APLICADOS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

Henrique Tomaz Gonzaga

Uberlândia

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**FRACIONAMENTO, DEGLICOSILAÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
PARCIAL E IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Strongyloides*
venezuelensis APLICADOS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

HENRIQUE TOMAZ GONZAGA

Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz

Orientadora

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha-Junior

Coorientador

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G642f Gonzaga, Henrique Tomaz, 1987-
2015 Fracionamento, deglicosilação química, caracterização parcial e
 identificação de antígenos de *Strongyloides venezuelensis* aplicados no
 imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana / Henrique Tomaz
 Gonzaga. - 2015.
 125 f. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa-Cruz.
Coorientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Strongyloides stercoralis* - Teses. 3.
Estrongiloidíase - Teses. 4. Antígenos - Teses. I. Costa-Cruz, Julia
Maria. II. Cunha Júnior, Jair Pereira da, 1974- III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

“Tudo que é realmente grande e
inspirador é criado pelo indivíduo
que pode trabalhar em
liberdade.”

Albert Einstein

A **Deus**, por guiar meus passos.

À minha avó, **Maria Galdina da Silva**, maior exemplo de família.

À minha mãe, **Maria Helena Tomaz Gonzaga**, e à memória de meu pai, **Reinaldo Gonzaga**, verdadeiros amigos! Não mediram esforços e cuidados. Juntos conseguimos chegar até aqui.

Ao meu irmão **Humberto Tomaz Gonzaga**, pelo companheirismo.

À **Priscila Silva Franco**, pelo amor, apoio constante e muita compreensão. Nossos caminhos não serão mais separados.

Agradecimentos

À minha família – avôs, madrinha e padrinho, tios e tias, primos e primas – o apoio e a torcida em todos os momentos de minha vida.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz, a orientação e por sempre permitir que os alunos alcem seus voos. Espero continuar na equipe. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, as inúmeras discussões de metodologia. A coorientação foi fundamental nas etapas de definição e discussão dos experimentos.

Aos Professores e às Professoras, por aceitarem o pedido de avaliação dessa tese nas bancas de qualificação e defesa e pelas valiosas contribuições.

À MSc. Daniela da Silva Nunes, as horas dispensadas, dias de trabalho, semanas de ajuda e meses de paciência. Essa tese poderia ser a sua.

À Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, o exemplo de resolutividade e a disponibilidade integral.

À Dra. Nágilla Daliane Feliciano e à MSc. Carla Vila-Verde, a colaboração nos artigos.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia e de Imunologia, em especial Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, a disposição que sempre demonstrou.

À MSc. Ester Cristina Borges Araujo e à Profa. Dra. Neuza Maria de Castro, por cederem, sempre com boa-vontade, tempo e ideias para os testes histoquímicos.

Ao MSc. Aelton Biasi Giroldo e à Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes, a contribuição com as possibilidades da análise estatística.

A todos os Professores da Pós-Graduação, o ensino.

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, o compartilhamento da rotina de trabalho.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Bioquímica e Histologia, o empréstimo de equipamentos.

À FAPEMIG, a bolsa de Doutorado concedida, em abril de 2013, após cumprimento dos requisitos definidos pela Deliberação/FAPEMIG nº 48, de 16 de agosto de 2010, pela Resolução 001/2010/CONPEP/UFU e interpretados pelo Colegiado do PPIPA na Ata da Reunião nº 137 de 09 de setembro de 2010; atualmente, regidos pela Resolução 02/2014 do Colegiado do PPIPA, com critérios inatingíveis para acumulação de bolsas de estudo por alunos de Pós-Graduação com atividade remunerada de sua área de formação.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, o apoio financeiro para produtos e equipamentos.

Aos que continuam da 62ª turma de Ciências Biológicas da UFU e às novas turmas, a amizade e os momentos de convivência!

E a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Classificação e morfologia do gênero <i>Strongyloides</i>	15
1.2 Aspectos do ciclo biológico de <i>Strongyloides</i>	17
1.3 Epidemiologia da estrongiloidíase humana	19
1.4 Patologia e sintomatologia	22
1.5 Resposta imune do hospedeiro	24
1.6 Diagnóstico da estrongiloidíase	27
1.7 Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrongiloidíase humana	31
1.8 Composição proteica e caracterização imunoquímica de <i>Strongyloides</i>	34
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Aspectos éticos	39
3.2 Amostras de soro	39
3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	41
3.4 Métodos parasitológicos	42
3.4.1 Coprocultura pelo método de Looss	42
3.4.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola e processamento das larvas recuperadas	42
3.5 Testes histoquímicos para detecção de carboidratos em larvas filarioides	43
3.6 Produção de extrato de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	45
3.6.1 Extrato salino	45
3.6.2 Tratamento do extrato salino e larvas com metaperiodato de sódio	45
3.7 Cromatografias do extrato salino de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	46
3.7.1 Cromatografia em resina de troca iônica	46
3.7.2 Cromatografia em resina de gel filtração	47
3.8 Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	48
3.9 Testes sorológicos	49
3.9.1 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	49
3.9.1.1 ELISA para detecção de IgG anti- <i>Strongyloides</i>	49
3.9.1.2 ELISA para detecção de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti- <i>Strongyloides</i>	50
3.10. Espectrometria de massas, pesquisa no banco de dados e identificação das proteínas	51
3.11 Análise estatística	56
3.12 Normas de biossegurança	56
4. RESULTADOS	56
4.1 Cromatografia de troca iônica na obtenção de frações antigênicas com potencial uso no sorodiagnóstico da estrongiloidíase	56
4.1.1 Obtenção de frações de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em resina DEAE	56
4.1.2 Análise do perfil eletroforético do ES e das frações DEAE S1 e DEAE S2 por SDS-PAGE	56

4.1.3 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES e frações DEAE S1 e DEAE S2	58
4.2 Caracterização imunoquímica e utilização de frações antigênicas deglicosiladas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> no diagnóstico da strongiloidíase humana	62
4.2.1 Tratamento de larvas filarioides e extrato salino de <i>Strongyloides venezuelensis</i> com metaperiodato de sódio	62
4.2.2 Análise do perfil eletroforético de ES, ES' e MP 1 e 2	66
4.2.3 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES, ES' e MP	68
4.2.4 Detecção de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-ES e -MP	71
4.3 Identificação de proteínas de larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i> reconhecidas por IgG de pacientes com strongiloidíase humana por técnicas proteômicas	73
4.3.1 Obtenção das frações de <i>S. venezuelensis</i> após cromatografia de gel filtração	73
4.3.2 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES e F1, F2, F3 e F4	77
4.3.3 Identificação dos peptídeos da fração F2 de <i>Strongyloides venezuelensis</i> por espectrometria de massa	81
5. DISCUSSÃO	87
5.1 Cromatografia de troca iônica na obtenção de frações antigênicas com potencial uso no sorodiagnóstico da strongiloidíase	87
5.2 Caracterização imunoquímica e utilização de frações antigênicas deglicosiladas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> no diagnóstico da strongiloidíase humana	90
5.3 Identificação de proteínas de larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i> reconhecidas por IgG de pacientes com strongiloidíase humana por técnicas proteômicas	97
6. CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros diagnósticos obtidos pelas curvas *receiver operating characteristic* (ROC) para detecção de IgG em amostras de soro humano utilizando o extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, tratado com tampão ácido (ES') – controle e oxidado com metaperiodato de sódio para deglicosilação (MP). 68

Tabela 2. Parâmetros diagnósticos obtidos pelas curvas *two graph-receiver operating characteristic* (TG-ROC) para detecção de IgG em amostras de soro utilizando o extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100. 77

Tabela 3. Caracterização de proteínas da fração F2, obtida por cromatografia de gel filtração em resina S-100, do extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* identificadas a partir de seus peptídeos por espectrometria de massa e inferidas pela busca em banco de dados para o gênero *Strongyloides*. 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Painel de amostras de soros. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS COM POTENCIAL USO NO SORODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE 40

Quadro 2. Painel de amostras de soros. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DEGLICOSILADAS DE *Strongyloides venezuelensis* NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA 40

Quadro 3. Painel de amostras de soros. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LARVAS FILARIOIDES DE *Strongyloides venezuelensis* RECONHECIDAS POR IgG DE PACIENTES COM ESTRONGILOIDÍASE HUMANA POR TÉCNICAS PROTEÔMICAS 41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-Sephrose – DEAE (DEAE S1 e DEAE S2, que interagiu com a resina). 57
- Figura 2.** Detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase (G1), outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos endêmicos normais (G3) pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações obtidas em cromatografia de troca iônica DEAE S1 (fração não-ligante) e DEAE S2 (fração que interagiu com a resina). 60
- Figura 3.** Curvas ROC indicando o *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*, AUC) (com os intervalos de confiança, IC) e *likelihood ratios* (LR+ e LR-) na detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações obtidas em cromatografia de troca iônica DEAE S1 (fração não-ligante) e DEAE S2 (fração que interagiu com a resina). Comparação da AUC de cada teste ELISA derivado do mesmo painel de soros utilizando como preparações antigênicas 61
- Figura 4.** Larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* não tratadas (PBS) ou tratadas com metaperiodato de sódio (MP; 60min) utilizadas em testes histoquímicos para detecção de carboidratos. **A.** Coloração ácido periódico-reativo de Schiff (PAS). **B.** Azul de alciano. **C.** Solução de Lugol. **D.** Cloreto de zinco iodado. **E.** Reagente de Fehling. 63
- Figura 5.** Larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* não tratadas (**A**) ou tratadas com metaperiodato de sódio (**B** – 30min; **C** – 1 h e **D** – 2 h) utilizadas em testes histoquímicos para detecção de carboidratos. Reagente de Fehling; notar diferença no padrão de coloração. Larvas não tratadas com marcação nas estruturas internas (esôfago e intestino) enquanto nas tratadas com metaperiodato a cutícula foi evidenciada. Barra 50 µm. 64
- Figura 6.** Curvas representativas de dosagens de conteúdo proteico (**A**) e de carboidratos (**B**) do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, tratado com tampão ácido (ES') – controle e tratado com metaperiodato (MP). 65
- Figura 7.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e tratado com tampão ácido (ES') – controle e oxidado com metaperiodato de sódio (MP 1) e reduzido com borohidreto de sódio (MP 2) – para deglicosilação. 67
- Figura 8.** Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (G1), outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis (G3) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) com utilização de extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e tratado com tampão ácido (ES') – controle ou oxidado com metaperiodato de sódio para deglicosilação (MP). 70

- Figura 9.** Diferença na detecção (densidade ótica, DO) das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase (G1), outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis (G3) pelo método ELISA utilizando extrato salino (ES) e antígeno deglicosilado com metaperiodato de sódio (MP) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*. 72
- Figura 10.** Perfil cromatográfico do extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). 74
- Figura 11.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e amostras representativas das frações de 1 mL obtidas após cromatografia resina de gel filtração S-100. 75
- Figura 12.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações obtidas após cromatografia resina de gel filtração S-100. Frações (F) definidas de acordo com o perfil observado nos tubos. F1 – tubos 22 e 23, F2 – 34 a 38, F3 – 42 a 46 e F4 – 50 a 59. 76
- Figura 13.** Curvas ROC indicando o *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*, AUC) (com os intervalos de confiança, IC) e *likelihood ratios* (LR+ e LR–) na detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro humano utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100. 78
- Figura 14.** Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (G1), outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis (G3) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) com utilização de extrato salino (ES) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100. 80
- Figura 15.** I. Predição de epítomos lineares de células B. II. Marcação dos determinantes antigênicos na sequência da proteína. III. Alinhamento das sequências de aminoácidos de membros da família. IV. Vista em *cartoon* da estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa. 83-86

RESUMO

Strongyloides stercoralis, nematódeo parasito intestinal, infecta milhões de pessoas. A reatividade cruzada é limitante para o imunodiagnóstico e é atribuída a complexidade dos preparados antigênicos e às glicoproteínas. Com o objetivo de aprimorar o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, este estudo avaliou frações antigênicas heterólogas obtidas de *Strongyloides venezuelensis*. O extrato salino (ES) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* foi fracionado por cromatografia de troca iônica (resina dietilaminoetil Sepharose – DEAE) nas frações DEAE S1 e DEAE S2 – que interagiu com a resina ou de gel filtração (resina Sephacryl S-100) nas frações F1, F2, F3 e F4. Larvas íntegras e ES foram tratados com metaperiodato de sódio (MP) para deglicosilação química e verificação de alterações nos carboidratos. O ES e suas frações foram avaliadas em eletroforese unidimensional para caracterização do perfil proteico e testados em amostras de soro [pacientes com estrogiloidíase (G1), com outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis de área endêmica (G3)] para detecção de IgG e subclasses anti-*Strongyloides* por ELISA. Sensibilidade (Se), especificidade (Es), *area under curve* (AUC), *likelihood ratio* (LR), *intermediate range* (IR) e *valid range proportion* (VRP) foram os parâmetros de diagnóstico calculados. A identificação de proteínas de interesse diagnóstico por espectrometria de massa foi realizada após seleção da fração por ELISA-IgG. Os epítomos de células B foram preditos. DEAE S1 e DEAE S2 apresentaram perfis proteicos complementares ao do ES, com enriquecimento de polipeptídeos diferencial (DEAE S1 – 21 a < 15 kDa; DEAE S2 – 21 a 50 kDa). A fração DEAE S2 obteve elevado valor diagnóstico para a detecção de IgG (Se 92 %, Es 93 %, AUC 0,981, LR+ 10,75, LR– 0,09). Larvas apresentaram marcação modificada para localização de carboidratos e no ES não foram encontrados carboidratos após MP. Os perfis eletroforéticos dos polipeptídeos foram semelhantes entre ES antes e após a adição de MP. Sensibilidade no ELISA atingiu 92,5 %, Es 94,6 %, LR+ 16,9 e LR– 0,08 para MP. Interação significativa entre subclasses de IgG e extratos foi demonstrada para pacientes com estrogiloidíase ($P = 0,02$), com redução nos níveis detectados. A fração F2 teve bandas marcadas nas regiões de 13, 22, 25, 30, 33, 37, 45, 60, 70 e 140 kDa. Os valores de IR e VRP foram melhores para o teste ELISA-F2 (IR 23; VRP 98,9 %). A média do índice ELISA (IE) no G1 foi maior para o ES, quando comparado às frações F1-F4 ($P < 0,0001$), mas F2 manteve a porcentagem de

amostras IgG-positivas (94 %). A redução do IE foi acompanhada da não detecção de IgG em G2. No G3 apenas F2 mostrou redução de IE em relação ao ES ($t = 7,020$, $P < 0,0001$). Foram selecionadas e excisadas as bandas de aproximadamente 60 e 33 kDa de regiões polipeptídicas de F2 no gel 1D para análise por espectrometria de massas. Foram consideradas com identificação confiável três proteínas homólogas de *Strongyloides ratti*: *aspartic protease 4* (ASP-4), 14-3-3 zeta e *heat shock protein 60* (HSP60). Concluiu-se que (1) a fração DEAE S2 demonstrou ser fonte de peptídeos sensíveis e específicos para detecção de IgG no sorodiagnóstico da estrogiloidíase humana, (2) a deglicosilação química do antígeno larval diminuiu a reatividade cruzada/ e os falsos positivos nos grupos controle, demonstrando o papel dos resíduos de carboidratos no reconhecimento da IgG e suas subclasses anti-*Strongyloides* e (3) F2, obtida após gel filtração, é composta por proteínas imunodominantes que permitirão a definição de epítomos para utilização em ensaios vacinais ou de diagnóstico da estrogiloidíase humana.

Palavras-chave: antígeno heterólogo; cromatografia; espectrometria de massas; glicoproteínas; *Strongyloides stercoralis*; sorodiagnóstico.

ABSTRACT

FRACTIONATION, CHEMICAL DEGLYCOSYLATION, PARTIAL CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF *Strongyloides venezuelensis* ANTIGENIC FRACTIONS IN HUMAN STRONGYLOIDIASIS IMMUNODIAGNOSIS

Strongyloides stercoralis, intestinal nematode parasite, infects millions of people. The cross-reactivity in immunodiagnosis is credited to antigenic complexity and glycoproteins. The aim of this study was to evaluate different heterologous antigenic fractions in human strongyloidiasis immunodiagnosis. Saline extract (SE) of infective larvae of *S. venezuelensis* was fractionated in ion exchange resin (diethylaminoethyl Sepharose - DEAE; fractions named DEAE S1 and DEAE S2 - which interacted with the resin) or gel filtration chromatography (Sephacryl S-100 resin) in F1, F2, F3 and F4. Larvae and SE were treated with sodium metaperiodate (MP) for chemical deglycosylation and verification of changes in carbohydrate content. SE and its fractions were evaluated in one-dimensional electrophoresis to characterize the proteic profile and were tested in serum samples [strongyloidiasis patients (G1), other parasitic infections (G2) and healthy individuals from an endemic area (G3)] for IgG detection and its subclasses by ELISA. Sensitivity (Se), specificity (Sp), area under curve (AUC), likelihood ratio (LR), intermediate range (IR) and valid range proportion (VRP) were calculated as diagnostic parameters. Protein identification by mass spectrometry was made after ELISA-IgG selection. B cell epitope prediction was performed. DEAE S1 and S2 showed protein profiles complementary to ES, with differential polypeptides (DEAE S1 - 21 to < 15 kDa; DEAE S2 - 21 to 50 kDa). DEAE S2 fraction presented higher diagnostic parameters for IgG detection (Se 92%, Sp 93%, AUC 0.981, LR+ 10.75, LR- 0.09). Larvae showed distinct localization of carbohydrates and no carbohydrates were detected in SE after MP-treatment. Electrophoretic profiles of polypeptides were similar between SE before and after MP treatment. ELISA sensitivity reached 90 % for MP, Sp 94.6 %, LR+ 16.9, and LR- 0.08. Significant interaction between IgG subclasses and extracts was observed for patients with strongyloidiasis ($P = 0.02$), i.e. reduction in detected levels. F2 gel filtration fraction showed bands of 13, 22, 25, 30, 33, 37, 45, 60, 70 and 140 kDa regions. IR and VRP values were better for ELISA-F2 (IR 23; VRP 98.9 %). ELISA index (EI) median in G1 was higher for SE when compared to F1-F4 fraction ($P < 0.0001$), however the F2 retained

IgG-positive samples (94%). The EI reduction was accompanied by no detection of IgG positive samples in G2 and only F2 showed EI reduction in G3 compared to ES IE ($t = 7.020$, $P < 0.0001$). Bands 60 and approximately 33 kDa polypeptide regions from F2 were selected and excised for mass spectrometry analysis. Three homologous proteins of *S. ratti* were considered with reliable identification: aspartic protease 4 (ASP-4), 14-3-3 zeta and heat shock protein 60 (HSP60). It was concluded that: (1) DEAE fraction S2 was a sensitive and specific source of peptides for IgG detection in human strongyloidiasis diagnosis, (2) chemical deglycosylation overcome cross-reactivity in the control groups, demonstrating the role of carbohydrate residues in the recognition of anti-*Strongyloides* IgG and its subclasses and (3) F2 obtained after gel filtration, is composed of immunodominant proteins, which will allow definition of epitopes for vaccine protocols and diagnostic assays in human strongyloidiasis.

Keywords: heterologous antigens; glycoproteins; chromatography; mass spectrometry; *Strongyloides stercoralis*; serodiagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação e morfologia do gênero *Strongyloides*

Espécies do gênero *Strongyloides* Grassi, 1879 ocorrem não só na maioria dos mamíferos, mas também em anfíbios, aves e répteis (LEVINE, 1979). No gênero, encontram-se parasitos de importância médica e veterinária. Atualmente, pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda Potts, 1932, classe Chromadorea Inglis, 1983, ordem Rhabditida Chitwood, 1933, família Strongyloididae Chitwood & McIntosh, 1934 (DE LEY; BLAXTER, 2002). *Strongyloides* inclui 52 espécies descritas, duas delas acometendo o intestino delgado do homem: *S. stercoralis* Bavay, 1876, com distribuição cosmopolita, mas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais; e *Strongyloides fuelleborni* von Linstow, 1905 encontrado na África, Filipinas e Ilhas de Nova Guiné, causando a estrongiloidíase ou anguilulose (SPEARE, 1989; PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996).

Em murinos, citam-se *Strongyloides rattii* Sandground, 1925 e *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 como espécies de relevância. *Strongyloides venezuelensis* foi isolado de ratos silvestres e é mantido em roedores de laboratório como modelo experimental para a estrongiloidíase humana e fonte de obtenção de antígenos heterólogos, utilizados no imunodiagnóstico (COSTA-CRUZ et al., 1997, 2003; MACHADO et al., 2003, 2008b; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; RODRIGUES et al., 2007, 2009; GONZAGA et al., 2011a,b; GONÇALVES et al., 2012).

As espécies de *Strongyloides* apresentam duas gerações, uma de vida livre e outra parasitária, com dimorfismo sexual na primeira e a presença de apenas fêmeas na segunda (MORAES, 1948). Seis formas evolutivas: fêmeas partenogenética parasita e de vida livre, macho de vida livre, ovos e larvas rhabditoides e filarioides são distintas morfologicamente (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2011).

A fêmea partenogenética parasita tem aspecto filiforme, com a extremidade

posterior afilada. A fêmea de *S. stercoralis* mede cerca de 2,5 mm de comprimento por 40 µm de largura, enquanto a de *S. venezuelensis* alcança até 3,2 mm por 41 µm. O revestimento é formado por uma cutícula delgada, com estriações transversais. O aparelho digestório é constituído por boca trilabiada; esôfago filariforme e longo; intestino simples; e orifício anal na extremidade posterior em posição transversal. Vulva ventral, posicionada no terço médio do corpo; dela, parte o útero anfidelfo; seguem-se os ovários, que, dependendo da espécie, são espiralados com o intestino; e os ovidutos, com os ovos enfileirados em seu interior; estes órgãos formam o aparelho reprodutor, que ocupa até 2/3 do organismo (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

A fêmea de vida livre ou estercoral é fusiforme, com a porção posterior afilada. Tanto a de *S. stercoralis*, quanto a de *S. venezuelensis* são menores que a fêmea partenogenética e medem até 1,2 mm por 70 µm e 1,2 mm por 130 µm no comprimento e largura, respectivamente. A cutícula é fina e com leves estrias, marcando-a transversalmente. Nessa forma evolutiva, o aparelho digestório também é simples e formado por boca pequena, esôfago curto e rabditoide, intestino simples e ânus próximo à extremidade posterior. O aparelho genital é organizado em vulva na região mediana do corpo, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal. O número de ovos no interior do útero é maior em relação à fêmea parasita (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

O macho de vida livre possui o corpo afusado e menor que o das fêmeas. Mede 0,7 mm de comprimento por 0,04 mm de largura em *S. stercoralis*, e 0,9 mm por 70 µm em *S. venezuelensis*. Tem revestimento similar ao das fêmeas. O sistema digestório é organizado em boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples, terminando em cloaca na região caudal. A cauda é recurvada ventralmente e apresenta dois espículos copulatórios, sustentados pelo gubernáculo. A genitália é constituída pelos testículos, vesícula seminal e canais deferente e ejaculador (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

As larvas rabditoides são os primeiros estádios larvais (L1 e L2) das espécies

de *Strongyloides* e medem de 200 a 300 μm no comprimento. As oriundas das fêmeas ester coral ou parasita são quase idênticas. Elas têm uma cutícula delicada e hialina recobrimdo-as. A boca é diminuta e o esôfago é do tipo rabditoide, com dilatações bulbiformes nas extremidades e constrição na parte mediana. O aparelho digestório é continuado pelo intestino, que termina em abertura anal espaçada da extremidade posterior. Observa-se, também, um primórdio genital nítido, formado por agregado de células (MORAES, 1948; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

Depois da segunda muda, as larvas de *Strongyloides* diferenciam-se em L3, que são as larvas filarioides. As L3 são alongadas e finas e medem 0,05 mm de comprimento, e a cauda tem detalhe entalhado característico (MORAES, 1948; LEVINE, 1979). Apresentam cutícula fina e estriada, ao microscópio óptico. A cutícula é dividida em cinco camadas: epicuticular, cortical, medial, fibrosa e basal, visualizadas em microscopia eletrônica. A estrutura típica da cutícula em *Strongyloides* são as anelações, ranhuras, epicutícula trilaminar, e as camadas mais basais amorfas e estriadas. A epicutícula tem componentes de superfície associados (MARTINEZ; SOUZA, 1997; DIONISIO et al., 2000). O vestíbulo bucal é curto, o esôfago filarioide e o intestino longo e estreito com ânus posterior. Podem seguir o curso evolutivo em vida livre ou ao penetrar no hospedeiro (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

Ovos das fêmeas parasita e de vida livre assemelham-se, com diferença apenas no tamanho, sendo os da última maiores. São estruturas elipsoides, de parede translúcida, a qual permite visualizar, no momento da oviposição, o embrião parcial ou totalmente desenvolvido (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

1.2 Aspectos do ciclo biológico de *Strongyloides*

As espécies de *Strongyloides* têm ciclos evolutivos complexos (ANDERSON, 2000; FERREIRA et al., 2007; VINEY; LOK, 2007). A maioria destes helmintos demonstra a habilidade de alternar gerações homogônicas (ou diretas) em etapas parasitárias e

heterogônicas (ou indiretas) em proles de vida livre. Essas fases são, comumente, divididas nos ciclos parasitários partenogenético e no sexuado de vida livre, ambos monoxênicos (REY, 2001; THOMPSON et al., 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

No ciclo direto, os hospedeiros humanos tornam-se infectados por *S. stercoralis*, quando L3 penetram ativamente o tegumento – pele ou mucosas da boca e esôfago. As larvas alcançam os vasos sanguíneos ou linfáticos e chegam aos pulmões. Nos capilares pulmonares, diferenciam-se em L4, atravessam a membrana dos alvéolos e migram pela árvore brônquica até a faringe. As L4 são, então, expectoradas pelo reflexo da tosse que provocam, ou deglutidas. Quando ingeridas, atingem o intestino, instalam-se na região do duodeno e jejuno, chegando à maturidade como fêmeas partenogenéticas parasitas, que iniciam a oviposição (MORAES, 1948; REY, 2001). Os ovos de *S. stercoralis* são eliminados, já larvados, na mucosa intestinal, e eclodem antes da eliminação das fezes. Esse fato torna difícil a visualização deles nas fezes de humanos infectados, a menos que o indivíduo esteja com diarreia grave (COSTA-CRUZ, 2011). O período pré-patente (PPP) em humanos – da penetração de L3 a oviposição da fêmea – para *S. stercoralis* é de, aproximadamente, 8 a 25 dias (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2011).

Strongyloides stercoralis tem a capacidade de se desenvolver em larvas filarioides infectantes, sem deixar o trato gastrointestinal. A infecção pode ocorrer pelos mecanismos de autoinfecção externa ou exógena, em que as larvas rabditoides, presentes na região perianal de indivíduos infectados, diferenciam-se em larvas filarioides infectantes e aí penetram, completando o ciclo direto. Pode ocorrer também autoinfecção interna ou endógena, na qual larvas rabditoides, presentes na luz intestinal (íleo ou cólon) de indivíduos infectados diferenciam-se em larvas filarioides infectantes. Por meio destes mecanismos, a doença pode persistir por meses ou anos, mesmo que não ocorram novas infecções (LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011). Na estrongiloidíase, é necessário buscar a erradicação do parasito e não somente a redução da intensidade de infecção, devido a essa habilidade de manter-se no indivíduo hospedeiro (SCHÄR et al., 2014).

Autoinfecção interna pode resultar na elevação do número de formas

evolutivas de *S. stercoralis* no intestino e pulmões, quadro conhecido como hiperinfecção. Quando a infecção atinge sítios não usuais do ciclo no humano é chamada disseminação (SIDDIQUI; BERK, 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

A contaminação do solo por fezes de indivíduos infectados pelo parasito possibilita a sobrevivência pelo ciclo indireto, desde que o substrato seja arenoso, úmido, aquecido com luz solar indireta e rico em matéria orgânica. No solo, as larvas rabditoides sofrem quatro diferenciações e resultam em machos ou fêmeas de vida livre. O encontro e a cópula destas formas de vida resultam em ovos que se desenvolvem em larvas filarioides infectantes (MORAES, 1948; THOMPSON et al., 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

O ciclo de vida de *S. venezuelensis* no hospedeiro murino é semelhante ao de *S. stercoralis* no humano, mas tem algumas particularidades. A rota de migração é comparável: as larvas migram pela rota clássica via corrente sanguínea, passando pelos pulmões, até atingir o intestino delgado (SATO; TOMA, 1990). No entanto, a espécie parasita de roedor, pode atingir o pulmão por migração de tecidos subcutâneos e musculares (TAKAMURE, 1995). *Strongyloides venezuelensis* elimina ovos nas fezes, em fases iniciais de clivagem (LITTLE, 1966), diferente de *S. stercoralis* em que larvas passam pelas fezes do hospedeiro. O fenômeno da autoinfecção em *S. venezuelensis* não ocorre em nenhuma espécie de roedor e o tempo de persistência da infecção é variável, por exemplo, até 570 dias em gerbil (BAEK et al., 2002). A infecção, em camundongo, é eliminada entre o 10º e o 14º dia pós-infecção e, quando reinfestado, provoca a morte das larvas durante o processo de migração (SATO; TOMA, 1990).

1.3 Epidemiologia da strongiloidíase humana

Parasitose de prevalência mundial, a strongiloidíase tem distribuição heterogênea e estima-se que cerca de 3 a 100 milhões de pessoas encontram-se infectadas por *S. stercoralis* (OLSEN et al., 2009; PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Quando causada por *S. fuelleborni*, essa infecção parasitária é zoonótica – infecta, principalmente, primatas não

humanos – e é rara em humanos (CIMINO; KROLEWIECKI, 2014).

Na realidade, o conhecimento das taxas de infecção nacionais e regionais e em populações de risco é mais relevante clínica e epidemiologicamente do que estimativas de prevalência global (SCHÄR et al., 2013b). Entre as infecções causadas por geo-helminths, a *estrongiloidíase* está entre as seis primeiras. Essa posição refere-se apenas às infecções ativas, uma vez que o número de pessoas potencialmente expostas ou com quadro de infecção subclínico é maior (BETHONY et al., 2006; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2007). Esta parasitose é considerada a mais negligenciada e sub-relatada de todas as infecções helmínticas negligenciadas (OLSEN et al., 2009; MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010; SCHÄR et al., 2013b) e com prevalência global aumentada nos últimos anos (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). A falta de ferramentas precisas de diagnóstico e monitoramento é uma limitação significativa para a compreensão mais completa da sua dinâmica, dos fatores de risco e da resposta a intervenções (CIMINO; KROLEWIECKI, 2014).

Foram definidas, por Stuerchler (1981 apud PIRES; DREYER, 1993), as regiões mundiais, de acordo com a prevalência da infecção por *S. stercoralis*: esporádica (< 1 %), endêmica (1-5 %) e hiperendêmica (> 5 %). As áreas hiperendêmicas estão situadas, notadamente, entre os trópicos, em especial nos países em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; FARDET et al., 2007; DEVI; BORKAKOTY; MAHANTA, 2011).

Nas regiões desenvolvidas do mundo, de climas temperados, como Sudeste da América do Norte e Europa, as infecções são frequentes com áreas de endemidade em regiões com trabalhadores da zona rural e também têm origem não autóctone, em razão dos imigrantes e viajantes/visitantes de áreas hiperendêmicas (CELEDON et al., 1994; SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008; OLSEN et al., 2009; MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010). Os índices de infecção, aumentados em muitos países desenvolvidos e regiões não endêmicas, aproximam-se dos valores das regiões de maior prevalência (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

Nos países desenvolvidos, as infecções helmínticas, incluindo a estrogiloidíase, podem ser controladas por programas de atenção básica à saúde e medidas de saneamento efetivo. Nos países em desenvolvimento, maiores regiões endêmicas, as helmintíases distribuem-se em larga extensão e nem mesmo o tratamento antiparasitário não protege o indivíduo contra a rápida reinfecção (ANTHONY et al., 2007). Devido à suposta baixa incidência – número de novos casos – em países industrializados, o falso diagnóstico e os erros no tratamento médico podem ocorrer (BOULWARE et al., 2007). Em relato recente, 5,8 % das amostras testadas de imigrantes brasileiros residentes nos Estados Unidos apresentaram níveis elevados de anticorpos anti-*S. stercoralis* (RAPOPORT; McCORMICK; COHEN, 2015).

No Brasil, a estrogiloidíase tem importância na saúde pública (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011) e as maiores taxas de prevalência foram encontradas nos estados do Amapá, Goiás, Rondônia e Minas Gerais, segundo publicação do Ministério da Saúde e revisão de estudos regionais (BRASIL, 2010; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Revisão de estudos na população em geral, com modelagem estatística e mapeamento, mostrou prevalência de 13 % no Brasil (SCHÄR et al., 2014). Em Uberlândia, Minas Gerais, foram reportados 13 % de positividade em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), 3,3 % em crianças hospitalizadas (PAULA et al., 2000), 33,3 % em alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002) e 12 % em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)/síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SILVA et al., 2005); os quatro trabalhos recorreram aos métodos de Baermann-Moraes (1917; 1948) e Lutz (1919). Ainda em Uberlândia, estudos realizados indicaram 3,8 % de prevalência de estrogiloidíase em pacientes diabéticos (MENDONÇA et al., 2006), 9,1 % em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO et al., 2008a) e 4,4 % em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009), com a mesma metodologia coprodiagnóstica. Esses resultados revelam que a cidade é área hiperendêmica.

1.4 Patologia e sintomatologia

Não há outra espécie de nematódeo parasito de humanos que tenham associado manifestações e síndromes clínicas tão amplas como *S. stercoralis*. Na estrogiloidíase, há três possibilidades de evolução da infecção: erradicação (eliminação do parasito), cronicidade (resultante da manutenção do ciclo por longos períodos) e complicação (hiperinfecção e disseminação) (GENTA, 1992; GROVE, 1996; FARDET et al., 2007). A infecção por *S. stercoralis* é, normalmente, autolimitada e de baixa morbidade em indivíduos imunocompetentes, tornando-se grave nos quadros de imunossupressão e imunodeficiências (CELEDON et al., 1994; KEISER; NUTMAN, 2004; FERREIRA, 2005; MARCOS et al., 2008; MONTES et al., 2009; BARROS; MONTES, 2014; WEATHERHEAD; MEJIA, 2014). O espectro clínico da infecção, nas fases aguda ou crônica, por *S. stercoralis* varia de quadros subclínicos a casos com sinais cutâneos, sintomas pulmonares e manifestações gastrointestinais (FERREIRA, 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

A ocorrência de autoinfecção nos humanos por helmintos é conhecida somente em *Capillaria philippinensis* Chitwood, Valesquez & Salazar, 1968 e *S. stercoralis* (CDC, 2013). Em relação a *S. stercoralis*, o fenômeno da autoinfecção explica a infecção persistente em imigrantes e viajantes, que moram distantes de área endêmica há muitos anos, e as síndromes de disseminação e hiperinfecção nos pacientes imunocomprometidos (GROVE, 1996; KEISER; NUTMAN, 2004; MARCOS et al., 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; BIGGS et al., 2009; BARROS; MONTES, 2014). Do mesmo modo, pessoas imunocompetentes, quando cronicamente infectadas por *S. stercoralis*, podem controlar por décadas a carga parasitária a níveis basais ou mantêm a infecção ativa por autoinfecção ou reinfecção, se de áreas endêmicas (GENTA, 1992, 1996; LIU; WELLER, 1993; FARDET et al., 2007).

A maioria dos portadores de *S. stercoralis* são oligo- ou assintomáticos. As alterações na estrogiloidíase manifestam-se de acordo com a migração do parasito pelos órgãos do hospedeiro. Sinais cutâneos, decorrentes da penetração das larvas infectantes,

como *larva currens* e urticária inespecífica são manifestações típicas. O sintoma pulmonar mais comum é a tosse seca ou com expectoração. Pulmões acometidos caracterizam-se, ainda, em maior ou menor intensidade, por crises asmatiformes decorrentes da presença de larvas filarioides e, ocasionalmente, de fêmeas. A migração e mudas das larvas 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 (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2011). As manifestações gastrointestinais incluem dor abdominal, vômito, náusea, diarreia, emagrecimento e obstipação (LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; FARDET et al., 2007; COSTA-CRUZ, 2011; KAKATI et al., 2011).

Nas formas graves, são reportados sinais e sintomas cutâneos, pulmonares e gastrointestinais mais sérios. Na pele podem aparecer exantemas petequiais e purpúricos. O envolvimento pulmonar acarreta em tosse, hemoptise e sibilos decorrentes da migração larval. Nos casos mais graves, há a possibilidade de ocorrer broncopneumonia e de desenvolver cavitações e abscessos associados às infecções bacterianas. Em relação ao trato gastrointestinal, a presença de ovos, larvas e fêmeas partenogênicas na mucosa intestinal, no caso grave de infecção pelo *S. stercoralis*, resulta em reação inflamatória e inclui sinais de esteatorreia, síndrome de má absorção, isquemia mesentérica, enteropatia perdedora de proteínas, íleo parálitico e obstrução intestinal (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; KEISER; NUTMAN, 2004; VAIYAVATJAMAI et al., 2008).

As manifestações extraintestinais podem levar a quadros graves, potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos por diversos fatores, por exemplo: desnutrição, corticoterapia, agentes citostáticos, leucemias, linfomas, insuficiência renal crônica, consumo de álcool, diabetes, tuberculose, lupus eritematoso sistêmico, vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e pacientes portadores de HIV/AIDS (KEISER; NUTMAN, 2004; FERREIRA, 2005; BARROS; MONTES, 2014). Deste modo, o quadro clínico da strongiloidíase está relacionada à carga parasitária e a fatores do hospedeiro.

1.5 Resposta imune do hospedeiro

Geralmente, agentes infecciosos podem ser divididos em micropatógenos, como as bactérias, e macropatógenos, por exemplo, os helmintos. Diferente da maioria das infecções micropatogênicas, que são agudas e de período curto, infecções macropatogênicas tendem a cronicidade (MAIZELS et al., 1993; MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003); e, provavelmente, *S. stercoralis* causa a infecção mais prolongada em razão de seu ciclo de autoinfecção (GEORGE et al., 2014).

Helmintos estimulam no hospedeiro, predominantemente, resposta dependente de linfócitos T CD4⁺ com perfil Th2 de produção de citocinas. A resposta imune, neste perfil, é caracterizada pela produção de interleucinas (IL) – IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21 – envolvidas no recrutamento e na ativação de células do sistema imune (OVINGTON; BEHM, 1997; ONAH; NAWA, 2000; MONTES et al., 2009; MAIZELS, 2003; TURNER et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2011). As interleucinas produzidas induzem rápida resposta humoral, mediada por anticorpos da classe E (IgE) antígeno-específica e resposta celular mediada por mastócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos, que auxiliam na morte das larvas (GENTA, 1996; WEINSTOCK; SUMMERS; ELLIOTT, 2005; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006; WEATHERHEAD; MEJIA, 2014).

Além de estimular uma resposta tipicamente de perfil Th2, as infecções helmínticas são capazes de induzir populações de células T reguladoras (Treg) (WANG; CAO; SHI, 2008). Na estrogiloidíase, as Tregs podem auxiliar no controle da morbidade, mas podem atuar na diminuição da resistência à infecção, conforme demonstrado em modelos animais (BLANKENHAUS et al., 2011). O aumento na população de Treg retardou a expulsão de *S. ratti* pela supressão de IL-9, ativadora de mastócitos (BLANKENHAUS et al., 2014); e, em humanos com estrogiloidíase, correlacionaram-se à diminuição dos níveis de IL-5, importante na resposta eosinofílica e estavam associadas à diminuição de IgE em células adjacentes ao parasito (BARROS; MONTES, 2014). Os helmintos modulam tanto a patologia dependente de Th2 como a inflamação mediada por Th17/Th1 (FINLAY; WALSH; MILLS, 2014).

No organismo humano, também desenvolvem-se respostas T-independente com produção de mediadores da inflamação antígeno-inespecífico pelos macrófagos. Estas moléculas são o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1, que estimulam a proliferação das células caliciformes do intestino, com consequente aumento na produção de muco. O muco é secretado na luz intestinal e reveste as fêmeas parasitas, o que previne o estabelecimento na mucosa ou leva à expulsão delas. Assim, proteínas do muco gastrointestinal, as mucinas, são constituintes da primeira linha de defesa do hospedeiro contra os helmintos. As mucinas são glicoproteínas poliméricas ricas em resíduos de aminoácidos, que se ligam a sítios para oligossacarídeos presentes no tegumento dos parasitos (MARUYAMA et al., 2000, 2002; ONAH; NAWA, 2000; MACHADO et al., 2005). Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), especificamente, TLR4, não modulam a morte larval durante a resposta imune inata, mas participam da morte de larvas de *S. stercoralis*, em modelo murino, durante a resposta imune adaptativa (KEREPSI et al., 2007). Mastócitos atuam na redução do número de fêmeas de *Strongyloides* no intestino, independente do recrutamento de outra célula do sistema imune, liberando proteases, que estimulam a contração da musculatura lisa (CHOI; ABRAHAM, 2015). Os antígenos de *Strongyloides* ativam eosinófilos por meio do sistema imune inato que atuam como células apresentadoras de antígeno para induzir a resposta de perfil Th2 (WEATHERHEAD; MEJIA, 2014), mas também eliminam seus grânulos e auxiliam na morte das larvas.

A imunidade protetora contra larvas infectantes envolve anticorpos específicos, a ativação do sistema complemento e de neutrófilos, em respostas de tipo citotoxicidade celular anticorpo-dependente (IRIEMENAM et al., 2010).

Os antígenos das larvas L3 de *S. stercoralis* ativam as vias clássica e alternativa do complemento, provocando a aderência de monócitos do sangue periférico e de granulócitos, por exemplo, neutrófilo, à superfície dessas larvas, causando a lise destas. Uma das estratégias de evasão do parasito consiste na secreção de proteases, que clivam os componentes do sistema complemento (MESSIAS; GENTA; MOHREN, 1994; COSTA-CRUZ, 2011).

Anticorpos das classes IgM, IgA e IgG específicos, além de IgE, também são

produzidos pelo hospedeiro humano, na resposta imune contra helmintos, incluindo *S. stercoralis*. A IgM *Strongyloides*-específica, que é produzida e identificada em infecção recente, apresenta pico de produção uma semana pós-infecção e mantém os níveis elevados por mais de duas ou três semanas. Títulos de IgG são detectados duas semanas pós-infecção, com um pico em torno da sexta, que persiste por até 20 semanas (GROVE; NORTHERN, 1982). IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo a entre 70-75 % do total de anticorpos séricos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010). Entre as subclasses de IgG, formam-se, principalmente, IgG1 e IgG4 no desenvolvimento da resposta contra *S. stercoralis* (ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). Credita-se à IgG4 o bloqueio na resposta protetora promovida pela IgE, ou seja, ela modula as respostas IgE-mediadas pela ligação em sítios dos mastócitos (ATKINS et al., 1997, 1999; RODRIGUES et al., 2007). A produção de IgE permite a degranulação dos mastócitos, que ainda induz a migração de eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

O aumento nos níveis de IgG4, que se segue às infecções primárias, possivelmente, reduz a expulsão dos parasitos, o que permite o estabelecimento crônico das fêmeas parasitas. Dessa maneira, a estrongiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas mediadas por IgE para a persistente autoinfecção, com redução dos efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997; MARCOS et al., 2008). No entanto, nos casos de doença disseminada e de imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS et al., 2008).

IgA é a segunda classe de anticorpo com maior concentração no soro humano e representa a classe mais proeminente nas mucosas e suas secreções. Por causa do ciclo do parasito envolver as mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA (ATKINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; MOTA-FERREIRA et al., 2009; RIBEIRO; MANHANI; COSTA-CRUZ, 2010; COSTA-CRUZ, 2011). Em casos crônicos com autoinfecção, o controle da imunidade ocorre pela presença de IgA, que modula a liberação das larvas (MARCOS et al., 2008). Pacientes com quadro clínico grave podem ter redução significativa da concentração de IgG, IgM e IgA (IRIEMENAM et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011).

1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é incerto, pois a maioria dos casos é assintomática, ou, quando com sintomatologia presente, os sintomas pulmonares e intestinais são comuns às outras parasitoses. Com isso, é necessária a utilização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWAL; GHOSHAL, 2009; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2014). Ferramentas precisas são necessárias para o diagnóstico da estrogiloidíase sintomática, para a identificação com alta sensibilidade de infecções assintomáticas em indivíduos, antes de receber terapias de imunossupressão ou detecção de infecção, após tratamento anti-helmíntico e, ainda, para avaliar com especificidade uma triagem clínica ou a prevalência em uma população (ANDERSON et al. 2014; BISOFFI et al., 2014).

Métodos parasitológicos diretos de diagnóstico consistem no encontro das formas evolutivas de *S. stercoralis*. Os parasitos, menos rotineiramente, podem ser encontrados em fluidos de aspirado duodenal, lavado brônquico, escarro, urina, esfregaço de sangue periférico e líquido; ou amostras de tecido sólido, como de biópsia de pele e endoscopia do sistema digestório (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; PIRES; DREYER, 1993; SUDRÉ et al., 2006; VAN DOORN et al., 2007; KAKATI et al., 2011; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013). Esses métodos são associados aos casos graves de estrogiloidíase. Geralmente, o diagnóstico definitivo é realizado pela pesquisa e encontro de larvas nas fezes. Entretanto, na maioria dos casos, a eliminação de larvas é pequena e irregular, o que dificulta a detecção da infecção (LIU; WELLER, 1993; UPARANUKRAW; PHONGRSI; MORAKOTE, 1999; SUDRÉ et al., 2006).

No intuito de aumentar a sensibilidade do exame coprológico, foram desenvolvidas técnicas de cultivo dos estádios larvais. Elas baseiam-se no desenvolvimento do ciclo indireto de *Strongyloides* e permitem a muda larvária e que se concentre o número de larvas (LIU; WELLER, 1993). Entre as técnicas de cultura, estão a de cultura em papel de

filtro (HARADA; MORI, 1955) ou em placa de ágar (KOGA et al., 1991; STEINMANN et al., 2007). Modificações em métodos coprodiagnósticos foram sugeridas na busca por aumento nas taxas de detecção de larvas, por exemplo, alterações nos métodos de concentração (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013). A técnica de concentração por formol-éter foi modificada quanto à preservação da amostra e tempo das etapas (ANAMNART; INTAPAN; MALEEWONG, 2013) ou reagentes utilizados (AHMADI; DAMRAJ, 2009).

Estádios larvais podem ser vistos em exame microscópico por métodos de recuperação em amostras fecais. Há apenas um relato de recuperação de estágios adultos, fêmeas e machos, em amostras de fezes (HONG et al., 2009). Os métodos de concentração de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948), e o de Rugai, Mattos e Brisola (1954) são indicados, uma vez que se baseiam no termo e hidrotropismo das larvas. As vantagens desses métodos, além do aumento da sensibilidade, são simplicidade, rapidez de execução e uso de grande volume de material fecal (REY, 2001). Uma revisão sistemática, seguida de meta-análise, das técnicas de exames de fezes, concluiu que as técnicas de Baermann (1917) e a cultura em placa de ágar são as que proporcionaram melhor diagnóstico na *estrongiloidíase* humana (POLANCO; GUTIÉRREZ; ARIAS, 2014).

Estudos demonstraram sensibilidade dos exames de fezes com variação de 15 a 24 %, com uma amostra, aumentando entre 55 e 78 %, quando utilizadas três amostras. Ainda assim, são necessárias sete amostras fecais frescas, colhidas em dias alternados, para se alcançar 100 % de sensibilidade (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001). A dificuldade do exame com várias amostras fecais reside no tempo necessário para coleta, inconveniência para o paciente e resistência do médico em solicitá-lo (HIRA et al., 2004). Deste modo, a falha em demonstrar larvas não pode ser interpretada erroneamente como ausência da infecção (SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995), sendo a próxima abordagem diagnóstica a realização de testes imunológicos e/ou moleculares (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

Os métodos de diagnóstico moleculares e imunológicos amplificam o material genético do parasito em amostras fecais ou detectam coproantígenos e diferentes classes de

imunoglobulinas específicas anti-*Strongyloides*, respectivamente. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o uso de antígenos recombinantes de larva filarioide em reações imunoenzimáticas, detalhadas a seguir. Na literatura, são descritos os antígenos recombinantes 5a e 12a (RAMACHANDRAN et al., 1998) e NIE de 31 kDa (RAVI et al., 2002) derivados de biblioteca de DNA complementar (*complementary* DNA, cDNA) de L3 de *S. stercoralis*. Peptídeos apresentados em fagos foram selecionados de biblioteca randômica, identificados e aplicados no sorodiagnóstico como mimetopos clonais recombinantes (FELICIANO et al., 2014).

Protocolos de reações em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), para detecção de material genético de *Strongyloides* em amostras humanas (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2010; SAUGAR et al., 2015) ou de roedores infectados experimentalmente (MARRA et al., 2010; PAULA et al., 2013), já foram elaborados. Os genes alvo das reações são a região do gene de RNA (*ribonucleic acid*) ribossomal (rRNA) 18S – mais frequentemente amplificado –, a região *internal transcribed spacer* 1 (ITS1) do gene rRNA, o gene da *cytochrome c oxidase, subunit 1* e a sequência repetida AYO28262 *Strongyloides*-específica (LOK, 2014). A sensibilidade das técnicas não foram superiores aos outros métodos parasitológicos no diagnóstico de casos de baixa carga parasitária (KNOPP et al., 2014) ou assintomáticos (SCHÄR et al., 2013a). As principais limitações são os inibidores de PCR encontrados, comumente, em amostras fecais e também em decorrência da quantidade pequena de amostra fecal utilizada vs. eliminação e distribuição descontínua de parasitos nas fezes (LOK, 2014; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2014).

Ensaio imunoenzimático para detecção de coproantígenos, recorrendo a anticorpos policlonais contra adultos de *S. stercoralis* (EL-BADRY, 2009; SYKES; MCCARTHY, 2011), em amostras fecais humanas ou L3 de *S. venezuelensis* (GONÇALVES et al., 2010), em fezes de ratos infectados experimentalmente, foram padronizados. Esses testes *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) apresentaram resultados satisfatórios, no entanto necessitam de validação clínica antes de serem aplicados na rotina (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2014).

Abordagens sorológicas para detecção de resposta imune contra *S. stercoralis* diferem nos alvos antigênicos (extratos totais, purificados ou antígenos recombinantes), na metodologia aplicada e se o ensaio é disponível comercialmente ou desenvolvido em laboratório (ANDERSON et al., 2014). Recentemente, kits comerciais foram disponibilizados no mercado e utilizam antígeno recombinante NIE (*InBios International*, EUA), antígeno não revelado (Scimedx, EUA), ou extrato somático de *S. ratti* (*Bordier Affinity Products*, Suíça). Eles demonstraram ser ferramentas adicionais disponíveis para apoiar a prática clínica ou ações em saúde pública (ANDERSON et al., 2014; BISOFFI et al., 2014).

A técnica de imunoprecipitação da luciferase (*luciferase immunoprecipitation system*, LIPS), desenvolvida no *National Institutes of Health* (NIH, EUA), combinada a antígenos recombinantes, tem apresentado resultados promissores na redução da reatividade cruzada (RAMANATHAN et al., 2008; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013). No entanto esse sistema é restrito, uma vez que os antígenos recombinantes necessitam de constructos específicos para a fusão luciferase-antígeno e cultura de células de mamífero, o que não é facilmente conseguido (FELICIANO et al., 2014).

Os testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e o de imunoeletrotransferência ou *immunoblot* têm sido mais empregados e são úteis no diagnóstico, na avaliação da resposta imune do humano e em estudos soroepidemiológicos, por apresentarem elevada sensibilidade (ROSSI et al., 1993; COSTA-CRUZ et al., 1997, 2003; PAULA et al., 2000; MACHADO et al., 2001, 2003; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN et al., 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009; BON et al., 2010; FELICIANO et al., 2010, 2014; GONZAGA et al., 2011a,b; BISOFFI et al., 2014). Além disso, são vantajosos no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico (BIGGS et al., 2009; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2014).

Estudos utilizando RIFI são direcionados para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos com variações: (1) nas preparações antigênicas, como suspensão de larvas ou corte destas em criostato; e (2) no protocolo de montagem das lâminas (COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001, 2003; MOTA-FERREIRA et al., 2009). O ELISA é o mais

conveniente, amplamente utilizado atualmente e em que tem se verificado sensibilidade e especificidade elevadas (SIDDIQUI; BERK, 2001; VAN DOORN et al., 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2011a,b; FELICIANO et al., 2014; CORRAL et al., 2015). A técnica de *immunoblot* é indicada como altamente sensível e específica no reconhecimento de frações proteicas imunodominantes de *Strongyloides* (ATKINS et al., 1999; SILVA et al., 2003; RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010).

Ferramentas promissoras, como os métodos sorológicos baseados em antígenos recombinantes e as técnicas moleculares, estão disponíveis em alguns centros de referência (FELICIANO et al., 2014). Por exemplo, os antígenos recombinantes não estão prontamente disponíveis em regiões endêmicas, e, assim, ainda faz-se necessário o uso de preparados larvais. O problema de obtenção da quantidade considerável de larvas *S. stercoralis*, para produção dos extratos empregados nos testes imunológicos, trouxe a necessidade de padronização e utilização de antígenos heterólogos (COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; MACHADO et al., 2001, 2003). Essa é apontada como uma das razões para a estrogiloidíase estar em condição de negligenciamento: a dificuldade para a execução dos experimentos com o parasito que infecta, naturalmente, somente humanos, macacos e cães (BONNE-ANÉE; HESS; ABRAHAM, 2011).

1.7 Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrogiloidíase humana

Espécies de *Strongyloides*, fontes de antígenos heterólogos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humanas, incluem *Strongyloides cebus* Darling, 1911, *S. ratti* e *S. venezuelensis* (CAMPOS et al., 1988; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997, 1998; MACHADO et al., 2001, 2003; HUAMAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; GONZAGA et al., 2011a,b). O desenvolvimento e a transmissão no gênero *Strongyloides* são similares, o que permite o uso de *S. venezuelensis* e *S. ratti* em modelos experimentais murinos para estudos da estrogiloidíase humana. Estes estudos têm auxiliado, além da padronização de novas técnicas de imunodiagnóstico, nas pesquisas

referentes à biologia molecular, terapêutica e aspectos da interação parasito-hospedeiro: ecologia, patologia e imunologia (NORTHERN et al., 1989; ABE; SUGAYA; YOSHIMURA, 1998; FERNANDES et al., 2008; GONÇALVES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; CHIUSO-MINICUCCI et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011; MACHADO et al., 2011).

A composição antigênica de *S. ratti* e *S. venezuelensis* foi comparada com a de *S. stercoralis*. Estudos mostraram que a sensibilidade e a especificidade não evidenciam diferença estatística significativa, quando comparados antígenos homólogo e heterólogo. Isso conferiu segurança e preferência no uso destas espécies como fontes de antígenos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 1997, 1998; HUAMAN et al., 2003; MACHADO et al., 2003, 2008b; RIGO et al., 2008; CORRAL et al., 2015).

A obtenção de larvas filarioides suficientes de *S. stercoralis* é considerada a principal limitação para o uso do antígeno homólogo no desenvolvimento de ensaios imunológicos. Caso a amostra fecal não provenha de um paciente com hiperinfecção e considerável eliminação de *S. stercoralis* (SIDDIQUI; BERK, 2001), não se consegue número necessário de larvas para preparação antigênica. A consideração dos últimos autores (SIDDIQUI; BERK, 2001) é estendida para a possibilidade de não ocorrer a geração de quantidades suficientes de larvas no processo de coprocultura (LOOSS, 1905 apud NEVES et al., 2011), seja para fazer o preparado antigênico ou para serem inoculadas no cão na manutenção experimental (GROVE; NORTHERN, 1982; GROVE, 1996). Além disso, mesmo com o método de coprocultura descrito, ele esbarra na dificuldade de acomodação e manutenção dos cães experimentalmente infectados. Apesar dos métodos de cultura em placa de ágar e papel filtro (HARADA; MORI, 1955; KOGA et al., 1991) e coprocultura serem sensíveis para o diagnóstico da estrogiloidíase e/ou para obtenção de larvas destinadas aos antígenos e inóculos, há dúvidas sobre a praticidade do uso na rotina laboratorial. Poucos laboratórios clínicos locais/referência continuam a oferecer esses métodos clássicos (ANDERSON et al., 2014). São considerados métodos com demora na obtenção dos resultados e estabelecem risco de infecção pela manipulação de larvas viáveis de *S. stercoralis* (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013).

Strongyloides ratti e *S. venezuelensis* são parasitos de roedores silvestres, por exemplo, o rato marrom *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e podem ser, favoravelmente, mantidos em ratos de linhagens desenvolvidas para uso na pesquisa. Ratos são animais facilmente sustentados em laboratório e eliminam considerável número de ovos de *Strongyloides* nas fezes. A coprocultura não oferece risco de infecção para os manipuladores, e o tempo na estufa é reduzido. Assim, pode-se manter a produção de antígeno no laboratório de forma constante e segura (GROVE; BLAIR, 1981; NORTHERN et al., 1989; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; MACHADO et al., 2001, 2008b; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; MACHADO et al., 2011).

Outra limitação dos testes sorológicos é a reação cruzada com outros parasitos, atribuída à complexidade antigênica dos helmintos (GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; CONWAY et al. 1993, a,b; ROSSI et al., 1993; LINDO et al., 1994, 1996; SILVA et al., 2003; SUDRÉ et al., 2006;). Testes para detecção de anticorpos com antígenos de *Strongyloides* sp. mostraram determinada reação cruzada para helmintos como: ancilostomatídeos, *Schistosoma* sp. Weinland, 1858, *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758, *Trichuris trichiura* (Owen, 1835) e filarídeos (GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; CONWAY et al. 1993a,b; LINDO et al., 1994, 1996; SILVA et al., 2003; ANDERSON et al., 2014; GONZAGA et al., 2011a, BISOFFI et al., 2014). Com esse quadro, a caracterização e a identificação de antígenos *Strongyloides*-específicos se fazem necessárias para o incremento da especificidade dos testes (NORTHERN; GROVE, 1987; LINDO et al., 1994; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Com baixa quantidade de larvas também não é possível o fracionamento e a análise dos antígenos para métodos sorológicos (ROSSI et al., 1993; RAVI et al., 2002). A disponibilidade de larvas, que podem ser conseguidas em grande quantidade em roedores experimentalmente infectados, facilitou a padronização e o uso de testes sorológicos para o diagnóstico individual e em inquéritos epidemiológicos. Deste modo, a obtenção e a identificação de antígenos de alta especificidade e sensibilidade, por meio do fracionamento e/ou tratamento químico de extratos totais de *S. venezuelensis*, por exemplo, subsidiam os estudos de diagnóstico sorológico da estrongiloidíase.

1.8 Composição proteica e caracterização imunoquímica de *Strongyloides*

Strongyloides venezuelensis é amplamente utilizado como espécie modelo para estudar a strongiloidíase animal e humana, porém as informações de sequências de genes, transcritos e proteínas para o gênero têm limitações (NAGAYASU et al., 2013; SANCHEZ-FLORES, 2013). Um projeto de genoma abrangente, que inclui *S. stercoralis*, *S. ratti*, *S. venezuelensis* e *Strongyloides papillosus* Wedl, 1856 está em fase de conclusão e os genomas destas espécies serão comparados (LOK, 2014). Destaca-se da análise transcriptômica de ovos/L1, L3, L3 pulmonares e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* a descoberta de transcritos de metaloproteases *astacin-like* dependentes de zinco e uma ferroquelatase exclusiva de nematódeos parasitos de animais (YOSHIDA et al., 2011; NAGAYASU et al., 2013; LOK, 2014). Em relação a larvas L3 de *S. stercoralis*, os resultados obtidos de análise proteômica parcial identificaram 26 diferentes proteínas, sendo a maioria associadas à superfície (MARCILLA et al., 2010). O transcriptoma foi publicado dois anos depois (MARCILLA et al., 2012), mas com poucos resultados de integração das duas frentes de pesquisa e sem mencionar perspectivas na integração com dados de genoma de *S. ratti*, sequenciado a época, mas não publicado (SANCHEZ-FLORES, 2013). Em investigação sistemática do proteoma de *S. ratti*, com ênfase nas proteínas de excreção/secreção com possível papel na resposta imune podem ser assinaladas, nas L3 infectantes, uma astacina ligada à invasão do hospedeiro, a proteína imunogênica NIE e a proteína de ligação a ácidos graxos e retinoide (*fatty acid retinoid-binding protein*) depuradora (*scavenger*) de lipídios do hospedeiro, entre as 586 proteínas do secretoma (SOBLIK et al., 2011; LOK, 2014).

A composição e as alterações no perfil proteico de *S. venezuelensis* foram investigadas nos estágios de larva infectante (nas fezes e no pulmão) e de fêmea partenogenética. Foram encontrados diferentes *spots* entre as formas evolutivas em eletroforese bidimensional (TSUJI et al., 1993). Houve aumento na expressão de um complexo de polipeptídeos entre 16-20 kDa e uma proteína de choque térmico, com 70 kDa, com função de termotolerância e transformação de parasitos com ciclo de vida complexo

(TSUJI; OHTA; FUJISAKI, 1997). A síntese dessas proteínas, durante a mudança entre estágios, deve ser crucial para regulação da infectividade do parasito (TSUJI; OHTA; FUJISAKI, 1997). O sistema ubiquitina-proteassoma foi estudado tendo como modelo *S. venezuelensis* para a detecção de atividade proteolítica em preparações de larvas e fêmeas. Foi demonstrado que a atividade da via é regulada durante o desenvolvimento (PAULA et al., 2009).

Os protocolos de fracionamento de antígenos totais de espécies de *Strongyloides*, já descritos, incluem a utilização de técnica cromatográfica e diferentes detergentes. Coluna de cromatografia com resina de interação hidrofóbica *octyl*-Sepharose foi utilizada para antígeno salino de *S. venezuelensis* (RIGO et al., 2008). O antígeno de larvas filarioides de *S. stercoralis* foi fracionado em coluna de gel filtração, e as frações foram empregadas em um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos (MANGALI et al., 1991). A separação em frações aquosa e detergente de antígeno salino de *S. venezuelensis* é protocolada com uso de detergente zwitteriônico sintético (RIGO et al., 2008). A aplicação de outros compostos surfactantes para recuperar antígenos de superfície/membrana e uso posterior em testes sorológicos é relatada para *S. ratti* e *S. venezuelensis* com detergentes aniônicos (deoxicolato de sódio e dodecil sulfato de sódio) (NORTHERN; GROVE, 1987; NORTHERN et al., 1989; CORRAL et al., 2015), catiônicos (cetrimida) e não-iônicos (Triton X100 e X114) (NORTHERN et al., 1989; FELICIANO et al., 2010). Diferenças quantitativas e qualitativas foram vistas nos perfis antigênicos depois do fracionamento e/ou solubilização com esses procedimentos, mas sem identificação dos polipeptídeos.

As glicoproteínas são proteínas com grupos de carboidratos ligados covalentemente e ocorrem em todos os organismos vivos. Desempenham várias funções, entre elas: transporte de compostos, estruturação da célula, adesão e reconhecimento celular, atuam como enzimas e têm papel imunológico como as imunoglobulinas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010). A abundância e a diversidade de funções desses compostos nos organismos justificam estudos para o entendimento da bioquímica, incluindo o imunodiagnóstico.

O fenômeno da reatividade cruzada nos testes sorológicos é atribuído, especialmente, à glicosilação dos antígenos. Para diminuir resultados falsos positivos, autores trataram preparados antigênicos com metaperiodato de sódio (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000; SUDRÉ et al., 2007; KIRINOKI et al., 2011). O periodato oxida grupos de hidroxilas vicinais de carboidratos em resíduos aldeídicos, alterando a estrutura de possíveis epítomos, o que permite a discriminação dos alvos das respostas de reatividade cruzada (EYLAR; JAENLOZ, 1962; WOODWARD; YOUNG JR; BLOODGOOD, 1985).

Ao caracterizar-se a organização estrutural, por microscopia eletrônica, da cutícula de adultos e larvas de *S. venezuelensis*, foi demonstrado que a superfície tem composição glicídica (MARTINEZ; SOUZA, 1995, 1997). A investigação da adesão de *S. venezuelensis in vitro* e *in vivo* revelou que há secreção de substâncias adesivas mucinosas produzidas pelas glândulas esofágicas (MARUYAMA; NAWA, 1997; MARUYAMA et al., 2000, 2003). Foi comprovado que essas substâncias são necessárias para a fixação dos parasitos à mucosa intestinal do hospedeiro, mas são bloqueadas por glicosaminoglicanos de mastócitos (MARUYAMA et al., 2000). A distribuição longitudinal das fêmeas parasitas é influenciada pelos carboidratos sulfatados da mucosa do hospedeiro (MARUYAMA; NAWA; OHTA, 1998; MARUYAMA et al., 2002). As moléculas secretadas pelas fêmeas partenogênicas mostraram perfil de adesão a lectinas, indicando natureza glicoproteica, (MARUYAMA; NAWA, 1997) e, após deglicosilação com metaperiodato, não foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 3D7-286 (MARUYAMA et al., 2003). Além disso, em larvas L3 de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão, foi detectado um grupo de transcritos regulados positivamente que codificam enzimas que catalisam a biossíntese de glicanos secretados que podem ser importantes na interação com o epitélio do hospedeiro (YOSHIDA et al., 2011; NAGAYASU et al., 2013). Assim, as substâncias glicoproteicas de *S. venezuelensis* têm importância no estabelecimento do parasito e no reconhecimento destas substâncias pelo hospedeiro.

Lectinas e enzimas glicolíticas foram empregadas na análise dos comportamentos termo e quimiocinético de *S. ratti*. O entendimento dos movimentos larvais é relevante para análise de mecanismos como a penetração na pele do hospedeiro e

posterior migração tecidual. Os tratamentos com aglutininas alteraram a percepção das pistas ambientais (TOBATA-KUDO; KUDO; TADA, 2005a,b). Ainda que existam variações moleculares e estruturais nos carboidratos dos termo e quimiorreceptores das várias espécies do gênero, acredita-se que funções similares são mantidas em *S. venezuelensis*.

Gonzaga e colaboradores (2011a) demonstraram que a fração antigênica, obtida de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, sem afinidade com concanavalina-A, apresentou melhor *performance* para detectar IgG. A avaliação de novos preparados antigênicos tem particular importância nos testes em que a detecção cruzada e casos falsos positivos não foram superados pelo aumento da diluição do soro. Além disso, determinar quando a indução de uma resposta isotipo-específica é direcionada ao reconhecimento de uma porção proteica ou glicídica tem implicações para o desenvolvimento de vacinas (FAIRLIE-CLARKE et al., 2010).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar diferentes frações antigênicas de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana.

Objetivos específicos

1. Isolar componentes antigênicos a partir do extrato salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em cromatografia de troca iônica e de gel filtração;
2. Tratar larvas filarioides de *S. venezuelensis* e seu extrato salino com metaperiodato de sódio para deglicosilação química e investigar histo- e quimicamente alterações no conteúdo de carboidratos;
3. Analisar o perfil eletroforético das frações antigênicas obtidas em gel de poliacrilamida unidimensional (1D);
4. Detectar anticorpos IgG anti-*Strongyloides* por ELISA, frente aos extratos/frações antigênicos obtidos, em amostras de soro para o diagnóstico da estrongiloidíase humana;
5. Avaliar o perfil de reconhecimento das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) do antígeno deglicosilado nos diferentes painéis de amostras de soro;
6. Identificação de proteínas de interesse, da fração obtida por gel filtração, por espectrometria de massa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz. De acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) o presente estudo foi aprovado sob o registro Nº 188/2009, como parte do projeto “Frações antigênicas de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana”. As amostras de soro dos grupos de estudo estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, no respectivo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. A manutenção dos espécimes humanos foi aprovada pelo CEP/UFU sob o protocolo Nº 041/2008. A obtenção de *Strongyloides venezuelensis* foi aprovada sob o parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) de Nº 075/2008 para o projeto “Manutenção da cepa de *Strongyloides venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar”.

3.2 Amostras de soro

Para validação do extrato total e das frações antigênicas foram testadas amostras de soro de três grupos. Grupo 1 (G1) – amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico definitivo para *Strongyloides stercoralis*. Grupo 2 (G2) – amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos. Grupo 3 (G3) - soro de indivíduos voluntários saudáveis baseados no perfil: moradores de área endêmica, região de Uberlândia, sem histórico e aspectos clínicos de infecção por *S. stercoralis*. As amostras de soro integraram o Banco de Amostras Biológicas após exames parasitológicos de fezes, realizados com, pelo menos, três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (1919). Segue abaixo a composição do painel de soros para cada objetivo.

Quadro 1. Painel de amostras de soros
CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS COM
POTENCIAL USO NO SORODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE

Grupo		Amostras (n = 155)	
G1	n = 50		
	Parasito(s)		n = 55
	Ancilostomatídeo		12
	<i>Ascaris lumbricoides</i>		6
	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>		1
	<i>Enterobius vermicularis</i>		5
	<i>Giardia lamblia</i>		6
	<i>Hymenolepis nana</i>		5
G2	<i>Schistosoma mansoni</i>		5
	<i>Taenia</i> sp. (teníase)		5
	<i>Taenia solium</i> (cisticercose)		3
	<i>Trichuris trichiura</i>		2
	Coinfecção		
	Ancilostomatídeo + <i>H. nana</i>		1
	<i>A. lumbricoides</i> + ancilostomatídeo		1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>		1
	<i>A. lumbricoides</i> + ancilostomatídeo + <i>T. trichiura</i>		2
G3	n = 50		

Quadro 2. Painel de amostras de soros
CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS
DEGLICOSILADAS DE *Strongyloides venezuelensis* NO DIAGNÓSTICO
DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA

Grupo		Amostras (n = 160)	
G1	n = 50		
	Parasito(s)		n = 60
	Ancilostomatídeo		10
	<i>Ascaris lumbricoides</i>		8
	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>		2
	<i>Enterobius vermicularis</i>		5
	<i>Giardia lamblia</i>		4
	<i>Hymenolepis nana</i>		5
	<i>Schistosoma mansoni</i>		8
G2	<i>Taenia</i> sp. (teníase)		5
	<i>Taenia solium</i> (cisticercose)		3
	<i>Trichuris trichiura</i>		4
	Coinfecção		
	Ancilostomatídeo + <i>H. nana</i>		1
	Ancilostomatídeo + <i>E. histolytica/dispar</i>		1
	<i>A. lumbricoides</i> + ancilostomatídeo		1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>		1
	<i>A. lumbricoides</i> + ancilostomatídeo + <i>T. trichiura</i>		1
	<i>E. histolytica/dispar</i> + <i>H. nana</i>		1
G3	n = 50		

Quadro 3. Painel de amostras de soros
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LARVAS FILARIOIDES DE *Strongyloides venezuelensis* RECONHECIDAS POR IgG DE PACIENTES COM ESTRONGILOIDÍASE HUMANA POR TÉCNICAS PROTEÔMICAS

Grupo		Amostras (n = 155)
G1	n = 50	
	Parasito(s)	n =50
	Ancilostomatídeo	10
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	10
	<i>Enterobius vermicularis</i>	5
	<i>Giardia lamblia</i>	2
	<i>Hymenolepis nana</i>	4
	<i>Schistosoma mansoni</i>	5
G2	<i>Taenia</i> sp. (teníase)	3
	<i>Taenia solium</i> (cisticercose)	2
	<i>Trichuris trichiura</i>	3
	Coinfecção	
	Ancilostomatídeo + <i>H. nana</i>	1
	Ancilostomatídeo + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>G. lamblia</i>	1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1
	<i>A. lumbricoides</i> + ancilostomatídeo + <i>T. trichiura</i>	1
	<i>E. histolytica/dispar</i> + <i>H. nana</i>	1
G3	n = 50	

3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* foi isolada de roedor silvestre *Necromys lasiurus* Lund, 1840 (Rodentia, Cricetidae), em abril de 1986, e cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta do Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O parasito é mantido experimentalmente pela infecção, por via subcutânea, em ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Rodentia, Muridae) da linhagem Wistar Greenman & Donaldson 1906, pelo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (UFU); água e ração oferecidas *ad libitum*.

Ovos e larvas rabditoides (L1 e L2) de *S. venezuelensis* presentes nas fezes dos ratos *Wistar* infectados foram mantidas em cultura de carvão animal por 3 dias a 28 °C, segundo Looss (1905 apud NEVES et al., 2011). Após este processo, larvas filarioides (L3)

foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954). As L3, depois de recuperadas, foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS; 0,15 M, pH 7,2), contadas e conservadas a -20°C até o momento das preparações antigênicas.

3.4 Métodos parasitológicos

3.4.1 Coprocultura pelo método de Looss

O material fecal dos animais infectados foi cultivado pelo método de Looss (1905 apud NEVES et al., 2011), misturando-se partes iguais de fezes e carvão animal úmido. Para a mistura foi utilizado béquer, bastão de vidro e recipientes plásticos descartáveis (100 mL). Os recipientes foram cobertos com gaze cirúrgica. As culturas foram colocadas em estufa do tipo demanda bioquímica de oxigênio (*biochemical oxygen demand*, BOD; TE 390, Tecnal, Brasil) à temperatura de 28°C e 70% de umidade por 3 dias. Após este procedimento as larvas foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.4.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola e processamento das larvas recuperadas

A recuperação das larvas de *S. venezuelensis*, após a coprocultura pelo método de Looss (1905 apud NEVES et al., 2011), foi realizada pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954). Cálices de sedimentação foram preenchidos com água corrente aquecida à temperatura de $40-45^{\circ}\text{C}$. Os recipientes de cultura, cobertos com gaze, foram embocados para o interior dos cálices, de modo que a água alcançasse toda a extensão da abertura. O sistema foi mantido em repouso por um período de 1 h. O sedimento com larvas foi coletado

com pipeta capilar longa e transferido para tubos. Cada tubo foi centrifugado a 1000 *g* por 15 minutos e submetido a cinco lavagens em PBS, durante 3 min, para retirada dos resíduos. Ciclos de centrifugação a temperatura ambiente. Após a última lavagem, o sedimento de larvas foi ressuspensão (PBS), e o número de larvas foi determinado, após diluição de 10 µL da suspensão, em microscópio óptico de luz (Eclipse E200, Nikon Instruments, EUA), no aumento de 4 vezes. As L3 de *S. venezuelensis*, recuperadas e contadas, foram utilizadas para manutenção da cepa, em ratos experimentalmente infectados, ou foram mantidas a -20 °C.

3.5 Testes histoquímicos para detecção de carboidratos em larvas filarioides

Testes histoquímicos para detecção de carboidratos foram empregados após tratamento das larvas filarioides de *S. venezuelensis* com metaperiodato de sódio (item 3.6.2). Aplicaram-se os métodos na busca por diferenças gerais na coloração entre larvas não tratadas, mantidas em PBS, ou oxidadas com metaperiodato de sódio (item 3.6.2).

A coloração ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS, *periodic acid-Schiff*) foi realizada e evidencia, principalmente, glicogênio e mucossustâncias. Em microtubos de polipropileno, as larvas foram oxidadas com ácido periódico (0,5 % em água destilada, 10 min). O material foi lavado com água destilada por centrifugação (15 x, 2000 *g*, 1 min, 1,5 mL). Depois, fixado (formol tamponado 10 %, 10 min), enxaguado (água destilada, 1 min) e corado em reativo de Schiff (1 g fucsina básica em 200 mL de água destilada até ebulição; resfriada a 50 °C e acrescida de 2 g metabissulfito de potássio e 10 mL ácido clorídrico 3,1 %. Após repouso de 24 h foi adicionado 0,5 g de carvão ativado, seguida de agitação por 1 min e filtração em papel filtro até obter solução de cor palha. O preparado foi armazenado em geladeira) por 30 min e lavado novamente, como descrito. As larvas foram então desidratadas (bateria: álcool 95 %, 10 seg – álcool 100 % (1, 2 e 3), 10 seg cada – xilol (1, 2 e 3), 10 min cada) e montadas em lâminas e lamínulas com goma Damar.

Para a coloração com solução azul de alciano (*alcian blue* 8G, 1 %. Corante preparado sob aquecimento (30 °C), agitação por 20 min e, ao fim, pH ajustado para 2,5), o corante foi adicionado às larvas em microtubo, após banho em ácido acético (3 %, 3 min), e deixada por pelo menos 2 h. As lâminas foram montadas como para PAS. O azul de alciano pode corar polissacarídeos ácidos, como glicosaminoglicanos, mucopolissacarídeos e outros.

A verificação de monossacarídeos e açúcares redutores foi feita utilizando reagente de Fehling (PURVIS et al., 1964 apud KRAUS; ARDUIN, 1997). Larvas foram colocadas em lâmina e sobre as mesmas pingou-se uma mistura recém-preparada (1:1; v/v) das soluções A (sulfato de cobre pentahidratado 6,8 % em água destilada) e solução B (hidróxido de sódio 10 % + tartarato de sódio e potássio tetra hidratado 35 % em água destilada). A lâmina foi aquecida em placa aquecedora até a fervura.

Testes com base em iodo, indicado para glicogênio, quitina e outros polissacarídeos, foram feitos utilizando solução de Lugol (LOCQUIN; LANGERON, 1983) e cloreto de zinco iodado (JENSEN et al., 1962 apud KRAUS; ARDUIN, 1997). Sobre as larvas foi pingada a solução de Lugol (1 g iodo + 2 g iodeto de potássio + 100-400 mL água destilada). A coloração temporária por cloreto de zinco iodado (100 g cloreto de zinco + 32 g iodeto de potássio + 0,4 g iodo + 24 mL água destilada) foi feita com o sobrenadante da mistura, após repouso. As larvas, em lâmina, receberam gotas do reagente e a montagem foi finalizada com lamínula. Após 1-2 min, na borda da lamínula, foi adicionada água e retirado o excesso de água e reagente com papel filtro.

O material foi fotografado ao microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera fotográfica digital acoplada (ICC50, Leica Microsystems, Alemanha) no Laboratório de Análise de Imagem, ICBIM, UFU. As colorações com reagente de Fehling, solução de Lugol e cloreto de zinco iodado foram feitas no mesmo dia da análise. O ambiente virtual de captura das imagens foi o programa Leica Application Suite EZ (LAS EZ, versão 1.8.0, Leica Microsystems, Suíça).

3.6 Produção de extrato de *Strongyloides venezuelensis*

3.6.1 Extrato salino

O extrato salino (ES) foi produzido a partir de alíquotas com aproximadamente 250.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. As larvas foram descongeladas e ressuspensas em PBS. Coquetel de inibidores de proteases foi adicionado e consistiu de 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 1 mM benzamidina, 1 µg/mL aprotinina, 2 µg/mL leupeptina (ROSKAMS; MELLICK; RODGERS, 2007); ou 100 µL/mL de extrato de cOmplete ULTRA (Tablets, Mini, EASYpac, Roche, Alemanha. Preparado conforme instruções do fabricante: 1 pastilha para cada 10 mL de água). Depois, as larvas foram rompidas por criólise em banhos de nitrogênio líquido e maceração em almofariz. Para os protocolos de cromatografia foi utilizado o menor volume possível de PBS para a maceração, no intuito de obter um ES de partida mais concentrado. Após esse procedimento, larvas inteiras não foram visualizadas em microscópio. O preparado foi incubado sob agitação lenta por 2 h a 4 °C e, em seguida, centrifugado a 12.400 *g* por 30 min a 4 °C.

O sobrenadante, ES, foi analisado para dosagem proteica pelo método de Lowry et al. (1951), distribuído em alíquotas e armazenado a –20 °C até o momento do uso.

3.6.2 Tratamento do extrato salino e larvas com metaperiodato de sódio

O processo de deglicosilação do ES foi realizado de acordo com o protocolo descrito na literatura (ZHUAGN et al., 1993; HERNÁNDEZ et al., 2008), com modificações. Extrato salino foi misturado ao metaperiodato de sódio (200 mM; Sigma, Alemanha) diluído em tampão ácido (acetato de sódio 200 mM, pH 4,5; Synth, Brasil). A solução foi mantida no escuro por 1 h à temperatura ambiente. Depois a reação foi interrompida com a adição de

borohidreto de sódio (concentração final 200 mM em PBS, 30 min, temperatura ambiente; Isofar, Brasil). Tanto a solução de periodato quanto a de borohidreto foram preparadas imediatamente no momento do uso. Como controles, ES foi incubado por 1 h 30 min à temperatura ambiente e outra alíquota foi tratada com tampão acetato de sódio e denominada de ES'.

Para análise do perfil eletroforético foram utilizados ES, ES' e os preparados logo após oxidação com metaperiodato de sódio (MP 1) e redução com borohidreto de sódio (MP 2). O ES, após deglicosilação, foi dialisado (PBS, 4-8 °C) e concentrado em unidades de centrífugo-filtração (Amicon Ultracel – 3K, Millipore, Irlanda), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 3 ciclos de centrifugação, o conteúdo foi recuperado, armazenado (–20 °C) e utilizado como MP. ES, ES' e MP tiveram analisados o conteúdo proteico (LOWRY et al., 1951) e de carboidratos pela reação fenol-ácido sulfúrico (MATSUKO et al., 2005).

De forma semelhante, larvas filarioides íntegras foram tratadas, com o protocolo descrito, para utilização em testes histoquímicos para detecção de carboidratos, com as seguintes considerações. O controle constituiu-se de larvas mantidas em PBS até o momento dos testes. Após adição de metaperiodato de sódio, no escuro, alíquotas de larvas foram mantidas nos tempos 30 min, 1 h ou 2h. Todos os passos foram realizados em microtubos, com troca de soluções após centrifugação (2000 *g*, 1 min). Ao final, o excesso de reagentes foi lavado como PBS e os tubos armazenados (–20 °C).

3.7 Cromatografias do extrato salino de *Strongyloides venezuelensis*

3.7.1 Cromatografia em resina de troca iônica

O extrato salino de *S. venezuelensis* foi fracionado em resina de troca iônica dietilaminoetil-Sepharose (GE Healthcare, EUA) – DEAE. A suspensão de resina foi distribuída

em microtubo (1,5 mL) e centrifugada (2000 *g*, 1 min) até atingir um volume final de resina de 200 μ L. A mesma foi equilibrada com 2 mL de PBS (4-8 °C, 2000 *g*, 3 x, 2 min) e procedeu-se ao fracionamento. Foram aplicados 200 μ L (1200 μ g) de extrato salino total, seguido de 20 min de agitação horizontal sob refrigeração. O sobrenadante constituiu a 1ª fração – DEAE S1 – *flow through* ou volume excluído, a qual não interagiu com a resina. Depois, a resina foi lavada com PBS (4-8 °C), 10 vezes o volume de resina – em ciclo de centrifugação (2000 *g*, 3 x, 2 min) – e eluída com tampão PBS (pH 8,0) acrescido de cloreto de sódio (0,5 M). O sistema foi agitado horizontalmente, por 10 min e, logo após, centrifugado (2000 *g*, 2 min). O sobrenadante deste constituiu a 2ª fração – DEAE S2 – com componentes analíticos que interagiram com o grupo DEAE. Depois de utilizada, a resina foi recuperada em ciclos de centrifugação, 3-5 vezes, de lavagens alternadas com tampões ácido (acetato de sódio, 200 mM, pH 4,5) e básico (carbonato-bicarbonato, 0,06 M, pH 9,6). A resina foi armazenada em etanol (20%) e armazenada sob refrigeração (4-8 °C). Foi realizada dosagem proteica das frações resultantes pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.7.2 Cromatografia em resina de gel filtração

Preparou-se a suspensão da resina para cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA) em volume final de 80 mL na coluna (vidro, tamanho 1,5 x 50 cm, volume máximo 89 mL, área da secção transversal 1,77 cm², Bio-Rad Laboratories, EUA), suficiente para aplicação do extrato salino (5 % do leito cromatográfico). A resina foi empacotada com água ultrapura à temperatura ambiente. Com uma pipeta a resina foi adicionada em movimentos circulares pela parede da coluna até formação de decantado homogêneo. Após o empacotamento, foi armazenada em refrigerador (4-8 °C).

A resina foi equilibrada em PBS com pelo menos 5 vezes o volume da coluna. O extrato salino (4 mL, concentração mínima de 6000 μ g/mL), após centrifugação e acréscimo de inibidores de proteases (coquetel descrito no item 3.6.1), foi aplicado à coluna

com auxílio de seringa (50 mL) e bombeado até o influxo total. Em seguida, foram adicionados e bombeados 4 mL de PBS (4-8 °C) para evitar a formação de câmaras de mistura. As frações foram coletadas automaticamente (modelo 2110, Bio-Rad, EUA) em alíquotas de, aproximadamente, 1 mL. O volume final coletado correspondeu ao dobro do volume da resina (160 mL).

As alíquotas foram monitoradas quanto à presença de conteúdo proteico pelo método de Bradford (1976) e lidas em espectrofotômetro de microplacas a 595 nm (Epoch, BioTek Instruments, EUA). O cromatograma foi gerado, e os tubos compreendidos no pico de absorbância foram analisados por eletroforese unidimensional, que permitiu a definição de quatro frações (F1-F4). Após o uso, a resina foi lavada com PBS e armazenada (4-8 °C) em PBS acrescido de azida sódica (0,1 %).

3.8 Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) foi realizada para analisar o perfil proteico do extrato salino e das frações antigênicas de *S. venezuelensis*. As amostras e o padrão de massa molecular (RECOM *BLUE Wide Range Protein Marker*, Real Biotech, Taiwan) foram submetidos à SDS-PAGE, em tampão descontínuo, condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970) e sistema de placas de vidro descrito por Studier (1973).

O gel foi preparado em suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical para mini-gel (SE300 miniVE, Hoefer, EUA), nas concentrações de 12 %, 13 %, 15 % ou 17 % para o gel de separação, e de 5 % para o gel de empilhamento. As concentrações dos géis de separação foram variadas para melhor resolução das amostras antigênicas. Antes da aplicação no gel, o extrato e as frações foram diluídos, em diferentes concentrações, em

tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM (pH 6,8) + SDS 4 % + azul de bromofenol 0,2 % + glicerol 20 %) e, então, submetidos à fervura por 3 min em banho-maria (100 °C). Após aquecimento, as amostras foram imersas, rapidamente, em banho de gelo e centrifugadas (2000 g, 1 min). As placas foram acopladas nas cubas contendo tampão de corrida Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 5,5 mM SDS). A migração dos polipeptídeos ocorreu em corrente constante de 20 mA.

A coloração foi realizada com nitrato de prata, pelo método de Friedman (1982) modificado, ou em azul de Coomassie G-250 (LAWRENCE; BESIR, 2009; DONG et al., 2011), ambos em aparelho de micro-ondas. Quando corados, foram mantidos em ácido acético 3% até a digitalização em *scanner* para documentação. A análise foi feita utilizando método gráfico pelo programa Image J (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA) e os picos do perfil de cada amostra foram comparados ao padrão de massa molecular referência em kiloDalton (kDa) para estimar as massas moleculares relativas.

3.9 Testes sorológicos

3.9.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para os ensaios ELISA, por titulação em bloco dos reagentes – extratos do mesmo lote, amostras de soro e anticorpos conjugados às enzimas para detecção dos anticorpos anti-*Strongyloides*. Por lote deve-se entender que para cada estudo foi preparado extrato salino e frações antigênicas suficientes para realização do teste ELISA.

3.9.1.1 ELISA para detecção de IgG anti-*Strongyloides*

A reação ELISA para detecção de IgG sérica foi realizada conforme protocolo descrito por Gonzaga e colaboradores (2011b), com modificações. Microplacas de

poliestireno (Greiner Bio-One, Alemanha) foram utilizadas como suporte para a adsorção do antígeno (ES; ES', MP; DEAE S1, DEAE S2; F1-F4) em concentração de 5 µg/mL, a um volume final de 50 µL/poço, em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6); e mantidas a 4 °C, durante 18 h, em câmara úmida. Depois de sensibilizadas, as placas foram lavadas por 3 vezes de 5 min cada, com PBS contendo Tween 20 a 0,05 % (PBS-T); nos protocolos com ES, ES' e MP apenas 1 vez, somente após sensibilização. Após as lavagens, foram adicionados 50 µL/poço das amostras de soro, dos grupos G1, G2 e G3, diluídas 1:160 em PBS-T contendo leite em pó desnatado (3 %, PBST-L). A incubação das amostras de soro ocorreu por 1 h a 37 °C. Após outro ciclo de lavagem, foram adicionados anticorpos anti-IgG humana Fc específica conjugado à peroxidase (1:2000 em PBS-T; Sigma, Alemanha) para detecção de IgG. A placa foi mantida por 1 h a 37 °C. Em seguida, após ciclo de lavagem, a reação foi revelada com solução cromógena de *o*-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio (10 mg *o*-fenilenodiamina (Sigma, EUA) + 10 µL peróxido de hidrogênio 30 % (Merck, Alemanha) + 25 mL tampão citrato-fosfato, 0,1 M, pH 5,5). A placa foi mantida por 15 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação interrompida pela adição de 25 µL/poço de solução 2 N de ácido sulfúrico. A leitura para obtenção da densidade ótica (DO) foi realizada em leitor de microplaca (TP Reader, Thermo Plate, Brasil) com filtro de 492 nm. Os valores foram expressos de acordo com o descrito no item 3.11.

3.9.1.2 ELISA para detecção de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*Strongyloides*

Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar 3590, Corning, EUA) foram sensibilizadas com ES, ES' ou MP, diluídos a uma concentração de 10 µg/mL (50 µL/poço) em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), e mantidas *overnight* a 4 °C. A seguir, foram lavadas por 1 vez com PBS-T (5 min). Cada amostra de soro foi diluída a 1:40 para a detecção de IgG1 e IgG3 e a 1:10 nos ensaios de IgG2 e IgG4, adicionadas às placas e incubadas por 1 h 30 min a 37 °C. A diluição do soro foi feita em PBST-L 3 %. Terminada a incubação, seguiu-se

ciclo de 3 lavagens (5 min cada) com PBS-T. Depois, os anticorpos secundários biotinilados anti-subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) (IgG1 e IgG4 – Calbiochem, EUA; IgG2 e IgG3 – Sigma, EUA) de IgG humana Fc específica foram adicionados na diluição de 1:1000. A diluição foi feita em PBS-TL 1,5 %, com período de incubação de 1 h 30 minutos a 37 °C. Seguiu-se outro ciclo de lavagem, e foi adicionada estreptavidina peroxidase (1:400 em PBS-T, 30 min a temperatura ambiente; Calbiochem, EUA). Posterior a um novo ciclo de lavagem com PBS-T, a reação foi revelada como descrito no item 3.9.1.1. A densidade ótica foi determinada em leitor de microplaca em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos de acordo com o descrito no item 3.11.

3.10. Espectrometria de massas, pesquisa no banco de dados e identificação das proteínas

A identificação de proteínas de *S. venezuelensis* por espectrometria de massas (*mass spectrometry*; MS) foi realizada após seleção da fração obtida por gel filtração com base nos melhores parâmetros no ensaio ELISA-IgG.

Bandas de gel resolvido em SDS-PAGE 1D 15 % e corados por nitrato de prata foram excisados manualmente. O procedimento de preparação de amostras para MS foi feito de acordo com o protocolo do *Biomolecule Analysis Core Facility* da *University of Texas at El Paso* (UTEP) disponibilizado em <http://science.utep.edu/bbrc/index.php/center-guidelines/how-to-submit-ms-samples>, acesso em 2014, com modificações. Em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool metílico, as bandas foram excisadas o mais precisamente possível. Todos os materiais foram previamente lavados com álcool metílico para diminuir contaminantes. Cada banda foi acondicionada em microtubo de polipropileno (1,5 mL), pré-lavado com acetonitrila, e então foi lavada com acetonitrila (4 x, 5 min) com agitação ocasional, para retirada de detergentes e sais residuais. Logo após, a acetonitrila foi removida por pipetagem e as amostras congeladas (–20 °C).

As análises seguintes foram realizadas pelo Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da Universidade Federal de São Paulo (USP, São Paulo), no Laboratório de Espectrometria de Massas – coordenado pela Profa. Dra. Sirlei Daffre. Após digestão enzimática os peptídeos resultantes foram analisados e sequenciados. A plataforma utilizada pelo CEFAP foi a EASY nanoLC II-LTQ Orbitrap Velos-ETD (Thermo Scientific, EUA) acoplada à técnica de nanocromatografia líquida (EASY-nanoLC II), na qual os peptídeos são separados em uma coluna com resina de fase reversa C18 (*reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC). A eluição sequencial dos peptídeos foi realizada em gradiente de acetonitrila por 45 min e separados e analisados no espectrômetro de massas (LTQ-Orbitrap Velos ETD).

Os espectros gerados foram processados com as ferramentas computacionais da plataforma, resultando em uma lista posteriormente pesquisada contra os bancos de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Entre os critérios de busca utilizados estavam: massas moleculares, perda do sítio de clivagem, pontos isoelétricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e possíveis modificações, como oxidação de metionina. Os resultados das identificações foram observados por *software* e validados de acordo com o *q-value*, que estima a taxa de classificações erradas entre um conjunto de espectros de massas. Os resultados obtidos foram selecionados em relação ao gênero *Strongyloides* e consideradas as identificações de proteínas com maiores *score*, taxa de cobertura e peptídeos únicos.

Análises básicas *in silico* foram obtidas no modo padrão dos programas/servidores, sem eventuais ajustes. O servidor ModWeb versão r163 (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>) foi utilizado para selecionar os *templates* de estruturas terciárias de outras proteínas, para a construção dos modelos das proteínas de *Strongyloides* sp. identificadas. As estruturas resolvidas e depositadas no *Protein Data Bank*, com o melhor *score* e *longest well scoring mode*, foram consideradas como *templates* principais. Somente um modelo parcial gerado foi considerado, a partir da identidade da sequência e outros parâmetros de qualidade confiáveis e, então, obtido o arquivo em extensão chimera. O programa UCSF Chimera versão 1.10.1 (*Resource for Biocomputing*,

Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, EUA) foi aplicado para análises dos gráficos moleculares, especificamente, a apresentação em *cartoon* da estrutura terciária com os epítomos preditos coloridos.

A predição de epítomos lineares de células B foi feita pelo método BepiPred disponível na plataforma de recursos *Immune Epitope Database Analysis Resource* (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). BepiPred prevê a localização de epítomos lineares de célula B usando uma combinação de *hidden Markov model* e *propensity scale method*. Os resíduos de aminoácidos com escores acima do limiar (padrão 0,35) são previstos como parte de um epítomo. Foram considerados epítomos preditos com pelo menos 3 aminoácidos.

O alinhamento de sequências múltiplas de proteínas da mesma família, presente em nematódeos ou no homem, foi realizado na ferramenta COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*; <http://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?CMD=Web>). Parâmetros de alinhamento padrão: *layout* de resíduos conservados e colunas com e sem *gaps*.

3.11 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional, com pacote estatístico, GraphPad Prism versões 5.0 e 6.0 (GraphPad Software, EUA). As variáveis foram analisadas com os testes específicos, paramétricos ou não-paramétricos, segundo a distribuição dos dados. Além dos testes de normalidade, inclusos no programa, foi realizado o teste de Lillefors disponível em <http://in-silico.net/tools/statistics/lillieforstest>.

Os dados de ELISA foram submetidos à análise pela curva *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC), que avaliou, em conjunto, os valores de sensibilidade e de especificidade para obtenção de um ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato/fração analisado, combinada com a *receiver operating characteristic curve* (ROC) (GREINER, 1995; GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995). A planilha de TG-ROC elaborada por Greiner

(1995) está disponível em: jim.mscs.mu.edu no diretório pub/Greiner. Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em densidade ótica (DO) ou por índice ELISA (IE) – valor de absorbância dividido pelo *cut-off*, para cada extrato antigênico. Consideraram-se como positivas as amostras com $IE > 1,0$, isto é $DO > cut-off$.

Análise de variância (ANOVA, F) ou teste de Friedman (F) com pós-teste de Wilcoxon (W) ou t de Student (t) para amostras pareadas foram conduzidos (SADOYAMA; SILVA; SOPELETE, 2005). A correção de Bonferroni-Holm para comparações múltiplas (HOLM, 1979) foi aplicada, quando 3 ou mais extrato/frações foram avaliados, para diferenças estatísticas na detecção de IgG. Quando o pós-teste realizado incluía comparações múltiplas, como o de Bonferroni e o de Dunn, não foi aplicado o fator de correção. *Two-way* ANOVA para os fatores antígenos (ES e MP) e subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), seguida de teste de comparação múltiplas de Šidák, foi usada para determinar como a resposta/detecção foi afetada pelos dois fatores.

A detecção de IgG utilizando cada preparação antigênica foi analisada em termos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es). Os índices foram determinados conforme as fórmulas previamente descritas (YOUDEM, 1950). Foram utilizadas as terminologias: verdadeiro positivo (a), verdadeiro negativo (d), falso positivo (b) e falso negativo (c); e as seguintes fórmulas: $Se = [a / (a + c)] \times 100 \%$; $Es = [d / (b + d)] \times 100 \%$. Construíram-se curvas ROC para descrever índices de eficácia diagnóstica (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003). Área sob a curva ROC ou *area under ROC curve* (AUC), índice da acurácia diagnóstica, foi calculada, e valores próximos a 1 indicam um teste informativo; valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; McNEIL, 1982).

A comparação de AUC entre antígenos, quando derivadas do mesmo painel de soro, foi feita pelo método descrito por Hanley e McNeil (1983). Razões de verossimilhança ou *likelihood ratios* (LR), parâmetros de eficiência diagnóstica independente da prevalência (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995), foram calculadas, como segue: $LR+ = Se / (1 - Es)$, a qual indica qual a probabilidade de pacientes com *estrongiloidíase* ter um teste específico positivo comparado com outros pacientes/indivíduos; e $LR- = (1 - Se) / Es$,

definida como a probabilidade de ter-se um resultado negativo no teste para pacientes com *strongiloidíase*. Valores de probabilidade (P) < 0,05 foram considerados significantes e intervalos de confiança (IC) de 95% foram apresentados para os cálculos de Se, Es e AUC.

Alternativamente, com dados de TG-ROC, os valores de: θ_0 – ponto de cruzamento das curvas de Se e especificidade Es, intervalo intermediário ou *intermediate range* (IR) – amplitude de valores de *cut-off* em DO para a interpretação de resultados e *valid range proportion* (VRP) – proporção da faixa de medição com resultados inequívocos foram apresentados para a comparação dos testes (GREINER, 1996). As medidas de dispersão apresentadas para IR foram o limite inferior e superior e para VRP 95 % IC. VRP e θ_0 não dependem da seleção de um único *cut-off*.

3.12 Normas de biossegurança

Os procedimentos de colheita e manuseio dos materiais biológicos e reagentes, como também a utilização dos equipamentos, foram cumpridos de acordo com as normas de biossegurança descritas no manual de Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia (BRASIL, 2006).

4. RESULTADOS

4.1

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS COM POTENCIAL USO NO SORODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE

4.1.1 Obtenção de frações de *Strongyloides venezuelensis* em resina DEAE

Foi utilizada a resina de troca iônica dietilaminoetil-Sepharose (DEAE) para fracionar o extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (ES) em DEAE S1 e DEAE S2, a qual interagiu com a coluna. A concentração proteica de extrato salino foi de 6000 µg/mL, e das frações DEAE S1 e DEAE S2 1400 µg/mL e 670 µg/mL, respectivamente.

4.1.2 Análise do perfil eletroforético do ES e das frações DEAE S1 e DEAE S2 por SDS-PAGE

Os perfis eletroforéticos das frações antigênicas, após serem submetidas à SDS-PAGE 12 % e coradas por nitrato de prata, são mostrados na figura 1. O ES mostrou componentes proteicos com massas moleculares variando de < 15 a 240 kDa. As frações DEAE S1 e DEAE S2 tiveram regiões de bandas diferenciais, como a de 82 kDa, e parcialmente complementares ao ES. Na fração DEAE S1, foi observada uma região enriquecida de 21 a < 15 kDa. A análise de DEAE S2 revelou um perfil proteico de maior amplitude, principalmente, nos componentes de 21 a 50 kDa.

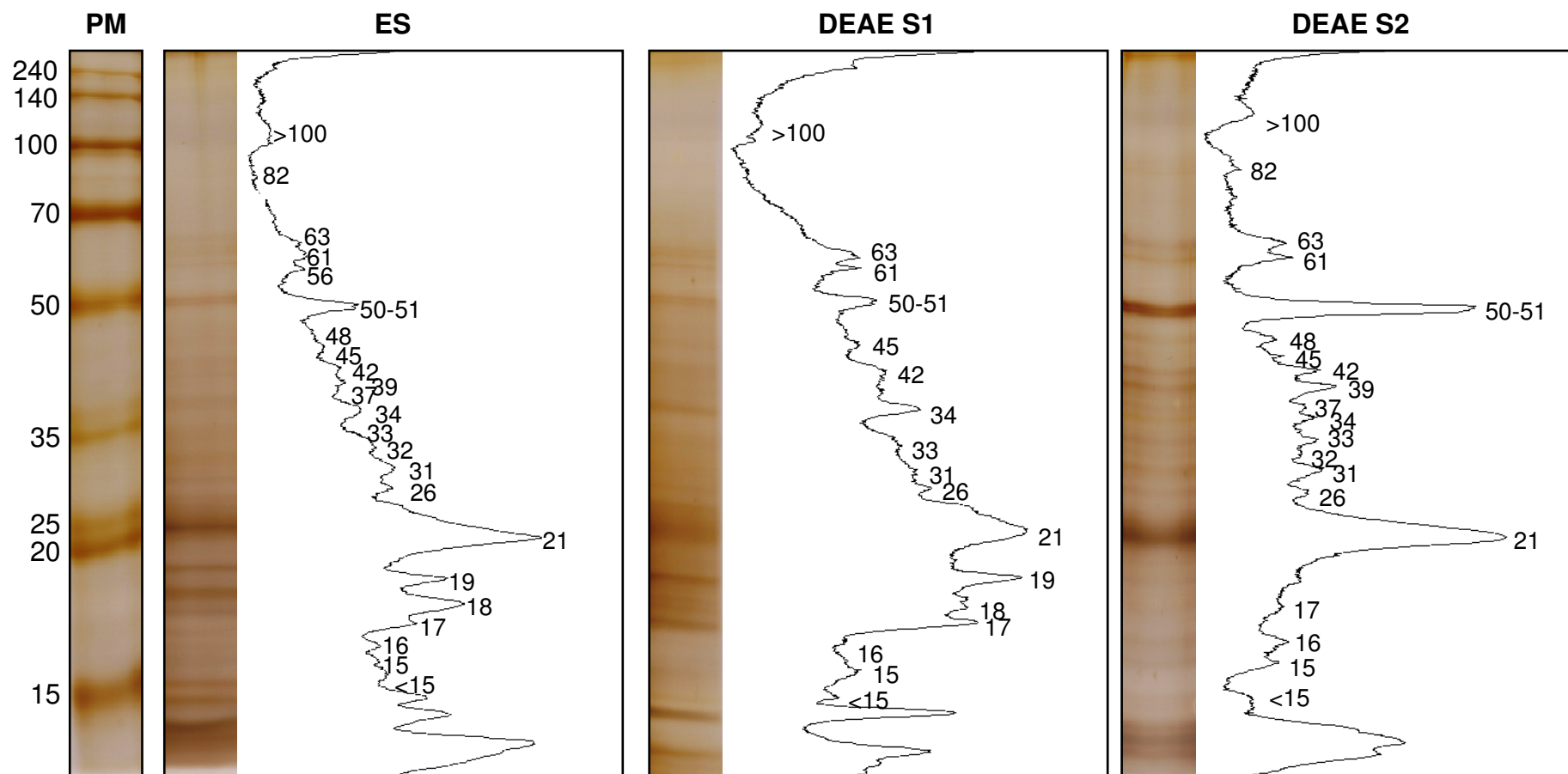


Figura 1. Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-Sepharose – DEAE (DEAE S1 e DEAE S2, esta última que interagiu com a resina) e análise pelo *software* Image J. SDS-PAGE 12 %, coloração por nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

4.1.3 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES e frações DEAE S1 e DEAE S2

As amostras de soros foram testadas por ELISA utilizando ES e suas frações obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE S1 e DEAE S2) (Figura 2). No G1, 88 % (44/50) das amostras foram positivas quando se utilizou o extrato salino total (ES), 80 % (40/50) em DEAE S1 e 92 % (46/50) para DEAE S2. Pela análise dos padrões de detecção em G2, taxas de positividade de 9 % (5/55) foram observadas utilizando ES e DEAE S1 e 5 % (3/55) para DEAE S2. No G3 a positividade foi de 20 % (10/50), 26 % (13/50) e 12 % (6/50) para ES, DEAE S1 e DEAE S2, respectivamente. Diferenças na positividade foram acompanhadas por uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos ($F = 21,71$; $P < 0,0001$) de acordo com a fração antigênica utilizada (Figura 2). Notadamente, a fração DEAE S2 apresentou a maior mediana no G1 (1,924; SA x DEAE S2, $W = -769,0$, $P = 0,0002$; DEAE S1 x DEAE S2, $W = -973,0$, $P < 0,0001$) e menor no G2 (0,512; ES x DEAE S2, $W = 1134,0$, $P < 0,0001$; DEAE S1 x DEAE S2, $W = 950,0$, $P < 0,0001$) e G3 (0,687; ES x DEAE S2, $W = 845,0$, $P < 0,0001$; DEAE S1 x DEAE S2, $W = -1099,0$, $P < 0,0001$).

A reatividade cruzada no G2 ($IE > 1$) foi observada quando testadas amostras de pacientes infectados com ancilostomatídeo (3/12 ES, DEAE S1 e DEAE S2), *E. vermicularis* (1/5 ES e DEAE S1), *G. lamblia* (1/6 ES) e *A. lumbricoides* (1/6 DEAE S1). Demais amostras de outras parasitoses não apresentaram resultados positivos. De acordo com o *cut-off* estabelecido pelas curvas ROC e TG-ROC, a sensibilidade e a especificidade foram, respectivamente, de 88 % e 85,7 % para ES; 80 % e 82,9 % para DEAE S1 (Figura 3). Quando aplicada DEAE S2 como fração antigênica conseguiu-se o melhor desempenho diagnóstico na detecção de IgG com valores iguais a 92 % de sensibilidade e 91,4 % de especificidade (Figura 3). Análise da curva ROC (Figura 3) demonstrou que os preparados antigênicos distinguiram eficientemente os pacientes com estrogiloidíase dos grupos controle. A eficiência do teste, indicada pela AUC, mostrou que a detecção de IgG utilizando a fração DEAE S2 ($AUC = 0,981$) atingiu o valor mais próximo ao valor máximo de eficiência ($AUC = 1,00$). Comparando as curvas ROC pelo método de Hanley e McNeil (1983), DEAE S2 atingiu um valor estatisticamente maior que ES ($AUC = 0,957$; $z = -3,464$, $P = 0,0008$) e DEAE S1 ($AUC = 0,915$; $z = -3,509$, $P = 0,0005$) (Figura 3).

LR+ para o ES foi de 6,16 e para a fração DEAE S1 4,67, indicando uma probabilidade moderada e pequena de um resultado verdadeiro positivo para *estrongiloidíase*, respectivamente. Para DEAE S2 o valor da LR+ (10,73) estabelece um teste eficiente. Os valores de LR- para ES (LR- = 0,14) e DEAE S1 (LR- = 0,24) sugeriram que ambos os testes tem um efeito moderado na diminuição na probabilidade do diagnóstico da doença, enquanto uma baixa LR- (< 0,1) para DEAE S2 (LR- = 0,09) praticamente exclui a chance de o paciente estar infectado (Figura 3).

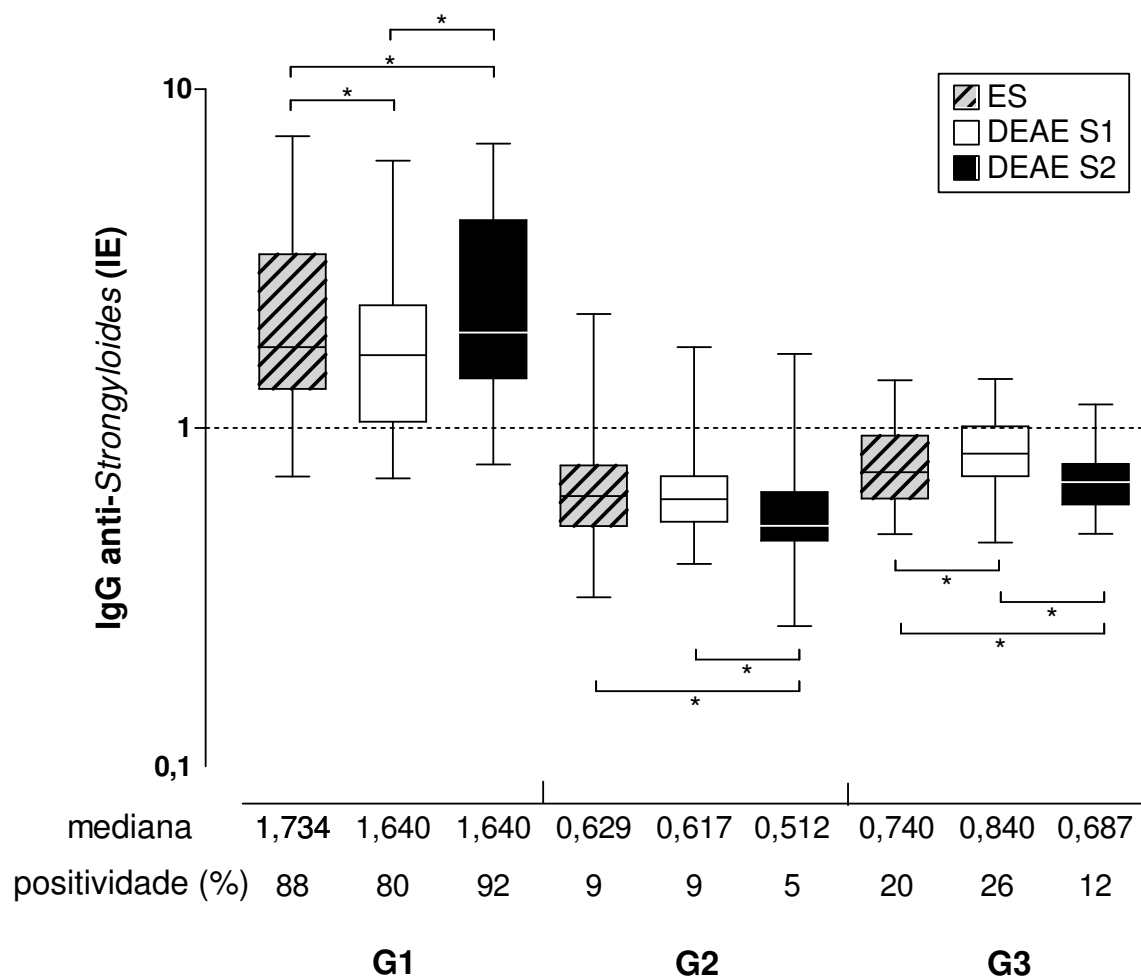


Figura 2. Detecção de IgG *anti-Strongyloides* em amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase (G1, n = 50), outras infecções parasitárias (G2, n = 55) e indivíduos endêmicos normais (G3, n = 50) pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* ou frações obtidas em cromatografia de troca iônica DEAE S1 (fração não-ligante) e DEAE S2 (fração que interagiu com a resina). Dados são apresentados em escala logarítmica em caixas e barras (*box-and-whisker plot*) com representação de mínimo, quartil inferior (25-50 %), mediana, quartil superior (50-75 %) e máximo. Linha pontilhada indica o *cut-off* do índice ELISA (IE = 1). Significância estatística foi calculada pelo teste de Friedman e pós-teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni-Holm (*P < 0,05).

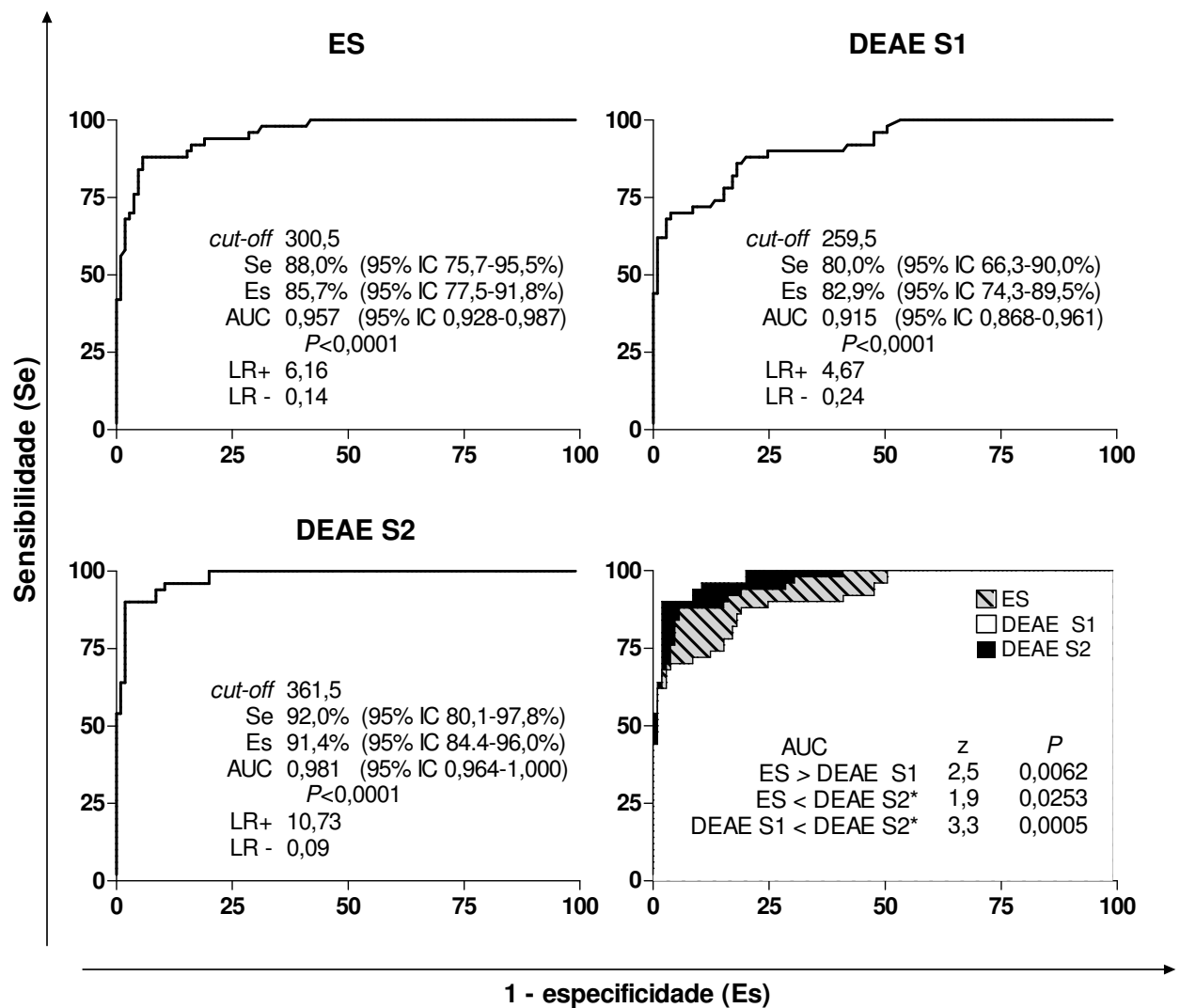


Figura 3. Curvas ROC indicando *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*, AUC) (com os intervalos de confiança, IC) e *likelihood ratios* (LR+ e LR-) na detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações obtidas em cromatografia de troca iônica - DEAE S1 (fração não-ligante) e DEAE S2 (fração que interagiu com a resina). Comparação da AUC de cada teste ELISA, derivada do mesmo painel de soros, utilizando como preparações antigênicas ES, frações DEAE S1 ou DEAE S2 pelo método de Hanley & McNeil.

4.2

CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DEGLICOSILADAS DE *Strongyloides venezuelensis* NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA

4.2.1 Tratamento de larvas filarioides e extrato salino de *S. venezuelensis* com metaperiodato de sódio

O processo de deglicosilação das larvas filarioides e do ES de *S. venezuelensis* foi realizado com metaperiodato de sódio. Os resultados dos testes histoquímicos para carboidratos são apresentados na figura 4. As colorações com PAS (Figura 4A), azul de alciano (Figura 4B) e solução de Lugol (Figura 4C) não apresentaram diferenças de marcação entre larvas controle, mantidas em PBS, e tratadas quimicamente em 3 tempos experimentais. A figura 4 apresenta dados do tempo de 60 min. Quando testados cloreto de zinco iodado (Figura 4D) e reagente de Fehling (Figura 4E) as larvas em PBS ou MP evidenciaram diferenças. Nas larvas não tratadas com MP as extremidades foram coradas em amarelo, enquanto nas tratadas a coloração foi uniforme. Larvas não tratadas tiveram marcação em marrom nas estruturas internas (esôfago e intestino) – Fehling-positivas; enquanto nas MP – nos tempos 30 min, 1 h e 2 h de oxidação por MP – apenas a cutícula foi evidenciada. As figuras 4E e 5 destacam o teste com reagente de Fehling das larvas filarioides de *S. venezuelensis* tratadas ou não com metaperiodato de sódio.

Os gráficos de dosagem de conteúdo proteico e de carboidratos e respectivas regressões lineares, com lotes representativos dos preparados de ES, ES' e MP utilizados na padronização e validação dos ensaios ELISA, são apresentados na figura 6. As dosagens indicaram manutenção de detecção de conteúdo proteico após etapas de diluição para controle/tratamento (ES = 1657 µg/mL; ES' = 687 µg/mL; MP = 415 µg/mL). A análise do conteúdo de carboidratos resultou em zero para MP, enquanto para ES = 228 µg/mL e ES' = 57 µg/mL.

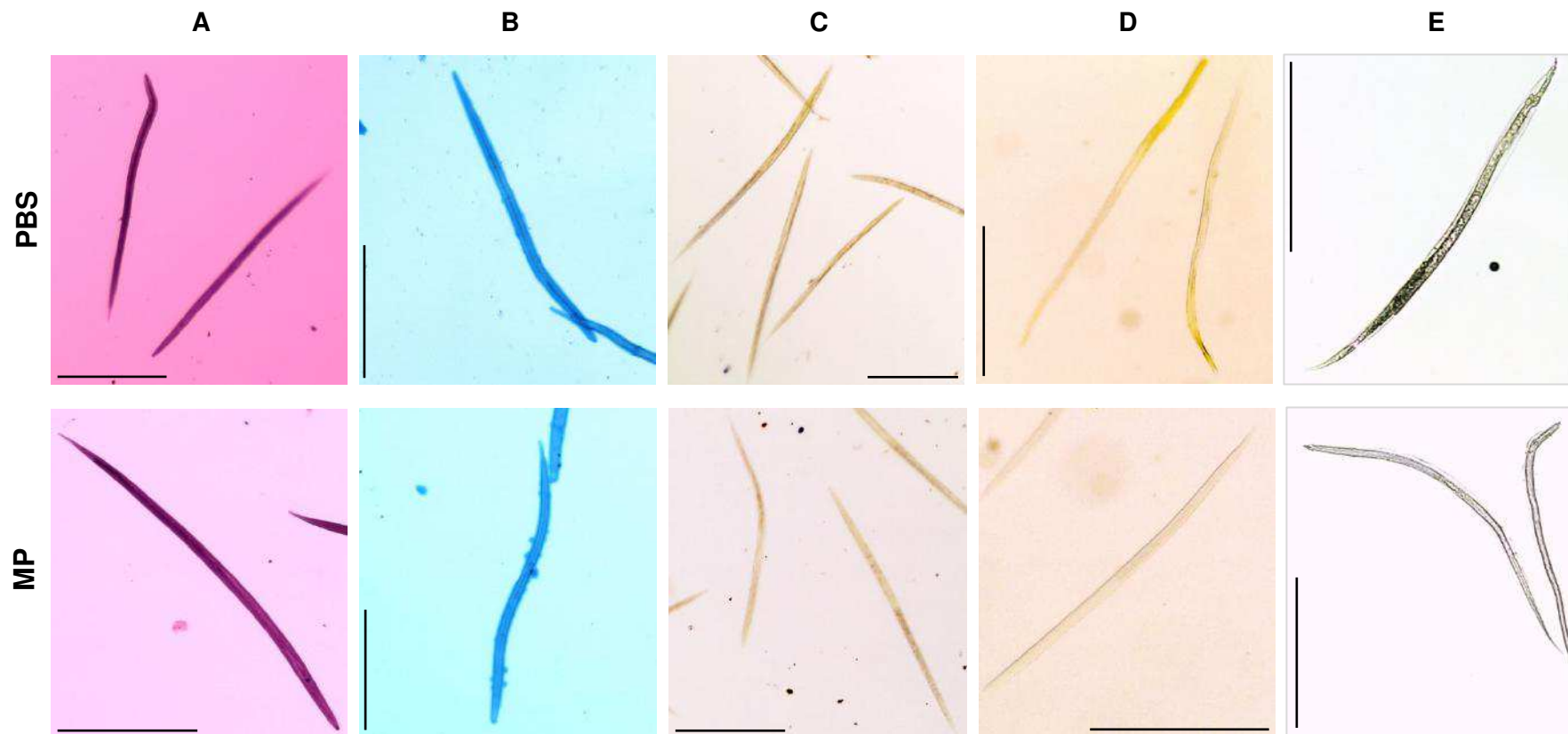


Figura 4. Larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* não tratadas (PBS) ou tratadas com metaperiodato de sódio (MP; 60 min) utilizadas em testes histoquímicos para detecção de carboidratos. **A.** Coloração ácido periódico-reativo de Schiff (PAS). **B.** Azul de alciano. **C.** Solução de Lugol. **D.** Cloreto de zinco iodado. **E.** Reagente de Fehling. Testes A-C não apresentaram diferenças na marcação, mas testes D e E diferenciaram larvas não tratadas das tratadas com MP, com destaque para E. Detalhes de E na figura 5. Barra 200 µm.

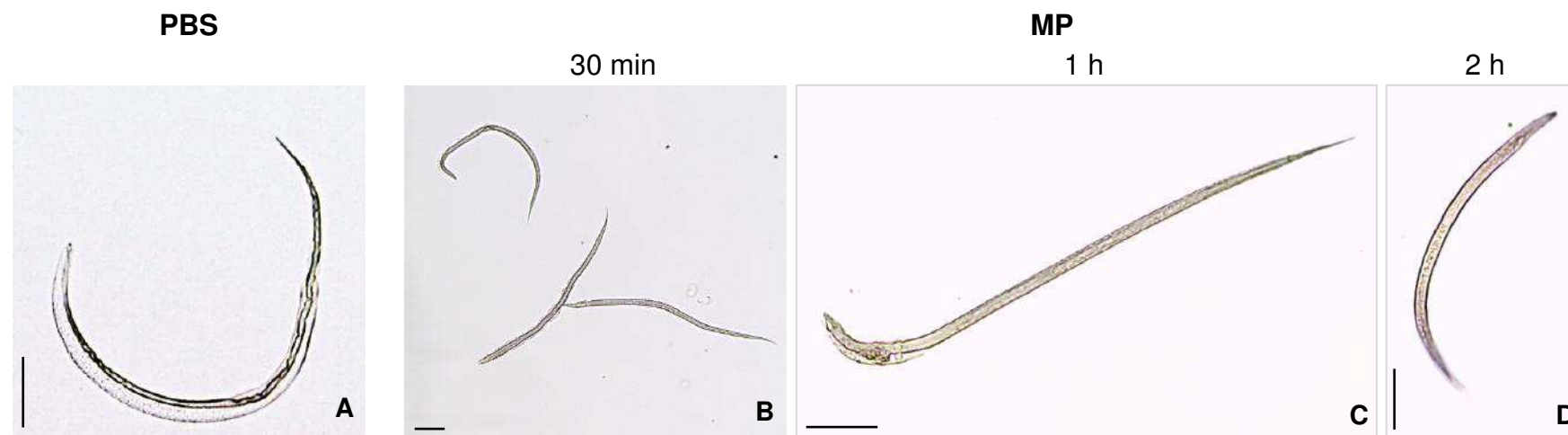


Figura 5. Larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* não tratadas (**A**) ou tratadas com metaperiodato de sódio (**B** – 30min; **C** – 1 h e **D** – 2 h) utilizadas em testes histoquímicos para detecção de carboidratos. Reagente de Fehling; notar diferença no padrão de coloração. Larvas não tratadas com marcação nas estruturas internas (esôfago e intestino), enquanto nas tratadas com metaperiodato a cutícula foi evidenciada. Barra 50 μm.

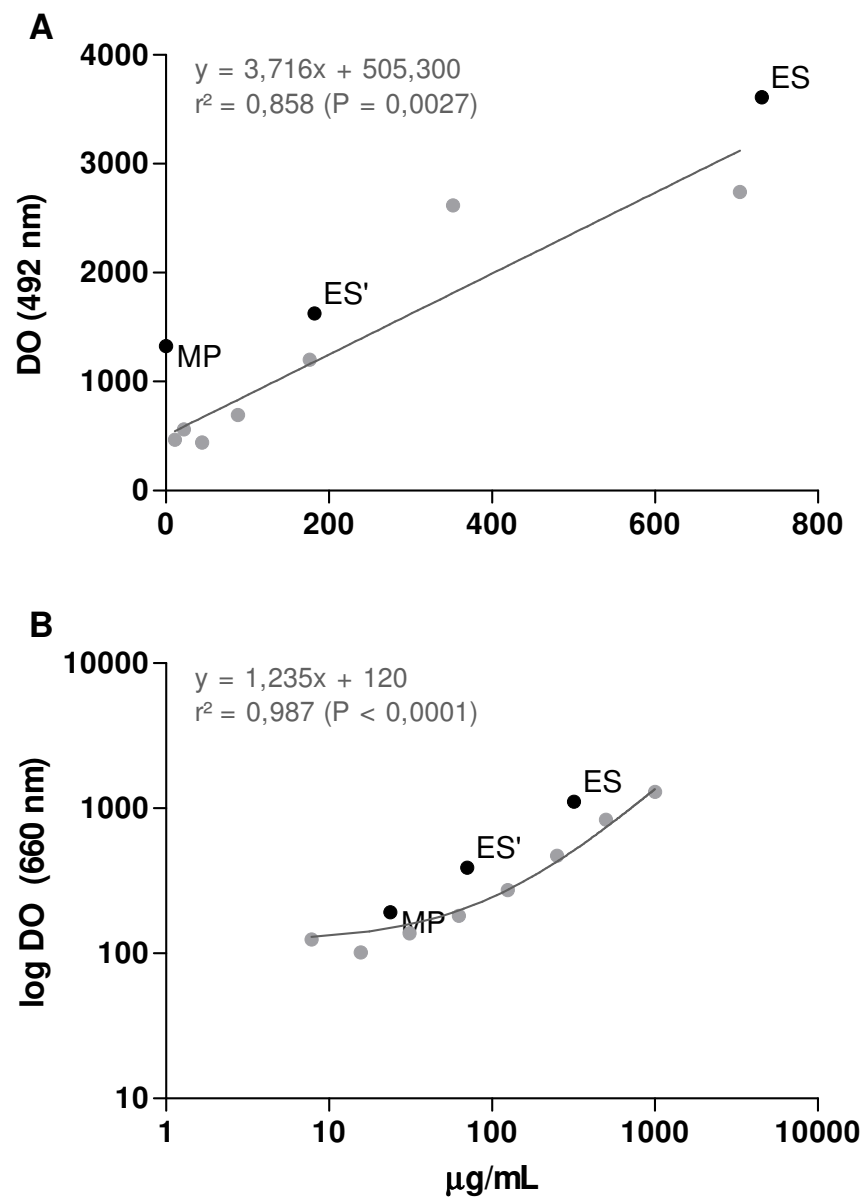


Figura 6. Curvas representativas de dosagens de conteúdo de carboidratos (A) e proteico (B) do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, tratado com tampão ácido (ES') – controle da reação do tratamento com metaperiodato (MP). Amostras (●) e padrões em diferentes concentrações (◐). DO – densidade ótica. Regressões lineares com coeficiente de determinação (r^2). Curva B apresentada em escala logarítmica apenas para visualização dos pontos.

4.2.2 Análise do perfil eletroforético de ES, ES' e MP 1 e 2

Após SDS-PAGE a 17 e 15% e coloração por nitrato de prata, foram analisados os perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, controle tratado com tampão ácido (ES'), oxidado com metaperiodato de sódio (MP 1) e reduzido com borohidreto de sódio (MP 2) – para deglicosilação (Figura 7). A caracterização em gel de duas concentrações permitiu complementar os perfis de marcação/resolução dos preparados antigênicos. Observou-se presença de polipeptídeos de peso molecular variando entre ≤ 7 a > 140 kDa no ES, com 23 picos definidos pelo gráfico. O ES' apresentou menor resolução, se comparado ao ES; destaca-se a marcação nas regiões de ≤ 7 , 8-10, 12-15, 16, 17,5, 18-19, 22, 23, 25, 26-31, 54, 56, 70 e > 100 kDa. Enquanto MP 1 – amostrado sem interrupção da reação – teve menor definição de bandas, no MP 2 foi possível a visualização de mais bandas. O perfil de MP 2 foi similar ao do ES: < 7 -8, 9-10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 21-22, 25, 26-31, 35, 42, 50, 54, 56, 66, 70 e > 100 kDa.

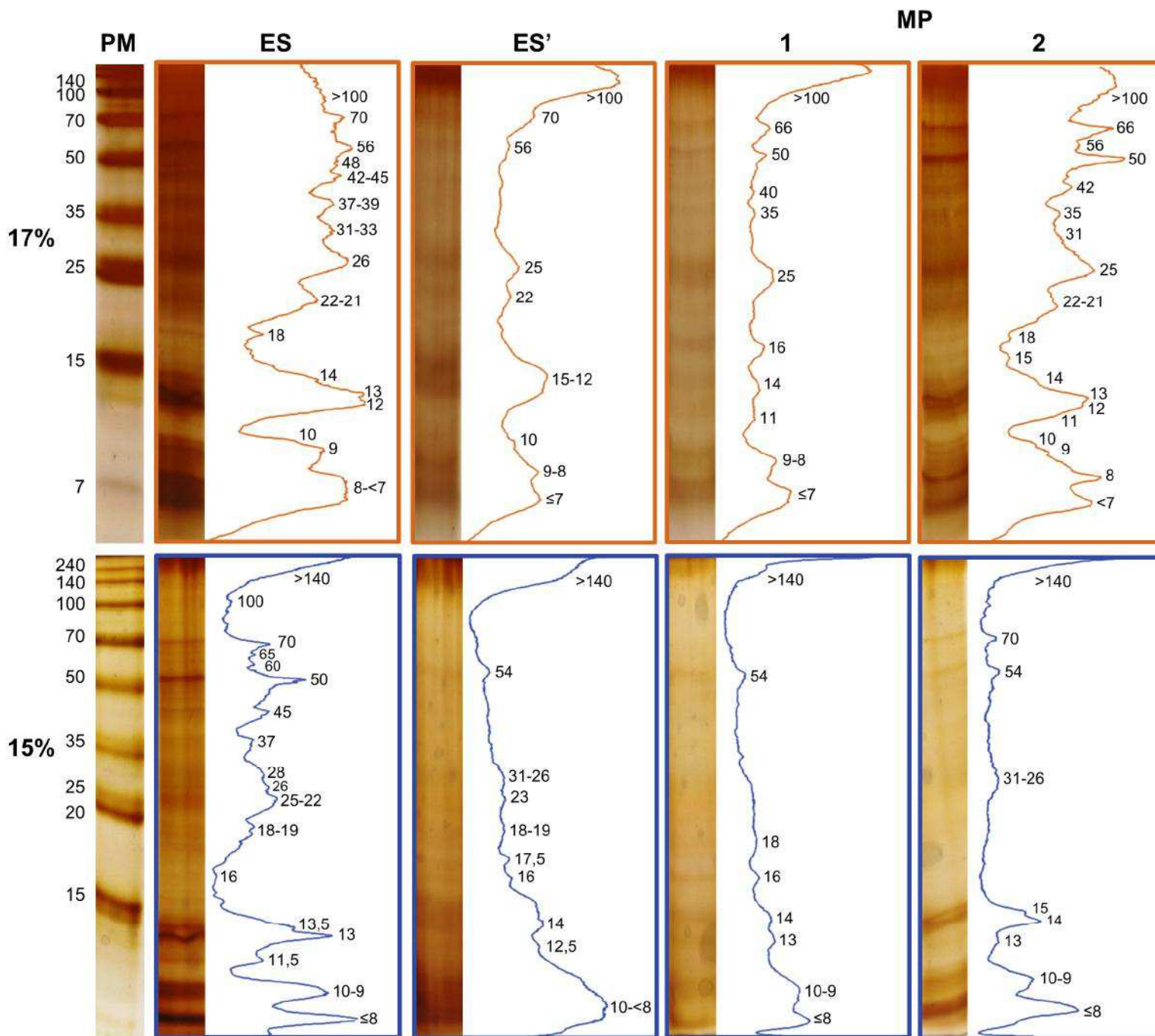


Figura 7. Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, tratado com tampão ácido (ES') – controle e oxidado com metaperiodato de sódio (MP 1) e reduzido com borohidreto de sódio (MP 2) – para deglicosilação. Análise pelo *software* Image J. SDS-PAGE 17 e 15% e coloração por nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

4.2.3 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES, ES' e MP

Curvas TG-ROC (Figura 8) e ROC (Tabela 1) foram construídas para obtenção dos parâmetros diagnósticos. A análise das curvas ROC (Tabela 1), confirmou que os testes ELISA tiveram altos valores de eficiência quando comparadas as AUC ($AUC > 0,960$; $P < 0,05$). No ponto de *cut-off* estabelecido (Figura 8), a sensibilidade atingiu 90 % para ES e ES'. O antígeno deglicosilado (MP) apresentou pequeno aumento na sensibilidade ($Se = 92\%$) e um considerável ganho na especificidade ($Es = 94,6\%$). *Likelihood ratios* assinalaram melhores valores para MP ($LR+ 16,87$, $LR- = - 0,08$), representando uma alta precisão diagnóstica para a *strongiloidíase*.

Tabela 1. Parâmetros diagnósticos obtidos pelas curvas *receiver operating characteristic* (ROC) para detecção de IgG em amostras de soro humano utilizando o extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, tratado com tampão ácido (ES') – controle e oxidado com metaperiodato de sódio para deglicosilação (MP).

Parâmetros diagnósticos	Preparados antigênicos		
	ES	ES'	MP
Área sob a curva (<i>area under curve</i> , AUC)	0,964 (0,929-0,999)	0,960 (0,923-0,998)	0,980 (0,964-1,000)
Sensibilidade (Se)	90,0 % (78,2-96,7 %)	90,0 % (78,2-96,7 %)	92,0 % (80,1-97,8 %)
Especificidade (Es)	88,2 % (80,6-93,5 %)	89,1 % (81,7-94,2 %)	94,6 % (88,5-98,0 %)
Likelihood ratio (LR)			
LR+	7,62	8,25	16,87
LR-	0,11	0,11	0,08

(95% intervalo de confiança)

A figura 8 mostra as curvas TG-ROC, *intermediate range* (IR), θ_0 e *valid range proportion* (VRP). As curvas de Se e Es da TG-ROC mostram valores pareados de acordo com um *cut-off*. O IR define a diferença entre intervalo de seleção de pontos de *cut-off* (DO) com resultados verdadeiros positivos e negativos no painel de amostras testadas e foi menor para MP (IR = 45 (619-644)) e maior para ES (IR = 215 (640-855)). Isto é, MP obteve uma margem de interpretação dos resultados menor. O ponto onde as curvas de Se e Es se cruzam, o índice θ_0 , foi maior no ELISA-MP ($\theta_0 = 92,4\%$), enquanto foi de 90 % para ES e ES'.

A VRP calculada demonstrou que o teste com MP ofereceu 97,4% dos resultados válidos, seguido de ES' (VRP = 93,7 %) e ES (VRP = 88,9 %) (Figura 8).

A reatividade cruzada no G2 foi devido a amostras de pacientes infectados com *E. vermicularis* (1/5 ES'), *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (1/1 MP), *S. mansoni* (3/8 SE e SE'; 1/8 MP), ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (1/1 ES, ES' e MP), *T. trichiura* (1/4 ES, ES' e MP), *H. nana* (1/5 MP) e cisticercose (1/3 MP). Porcentagem de amostras positivas no G3 foi zero no ELISA-MP, 16 % no teste com ES e 10 % com ES'.

Notavelmente, quando comparados os níveis de IgG anti-*Strongyloides* no mesmo grupo de amostras, a deglicosilação química provocou uma redução significativa na DO (Figura 8). Amostras de soro testadas com o antígeno MP apresentaram menor média de DO nos pacientes com estrongiloidíase ($F = 48,59$, $P < 0,0001$) e com outras parasitoses ($F = 25,77$, $P < 0,0001$). Em comparação, G3 teve a mediana da DO no grupo reduzida após o controle com tampão acetato (ES') e também após tratamento com MP ($F = 43,13$, $P < 0,0001$).

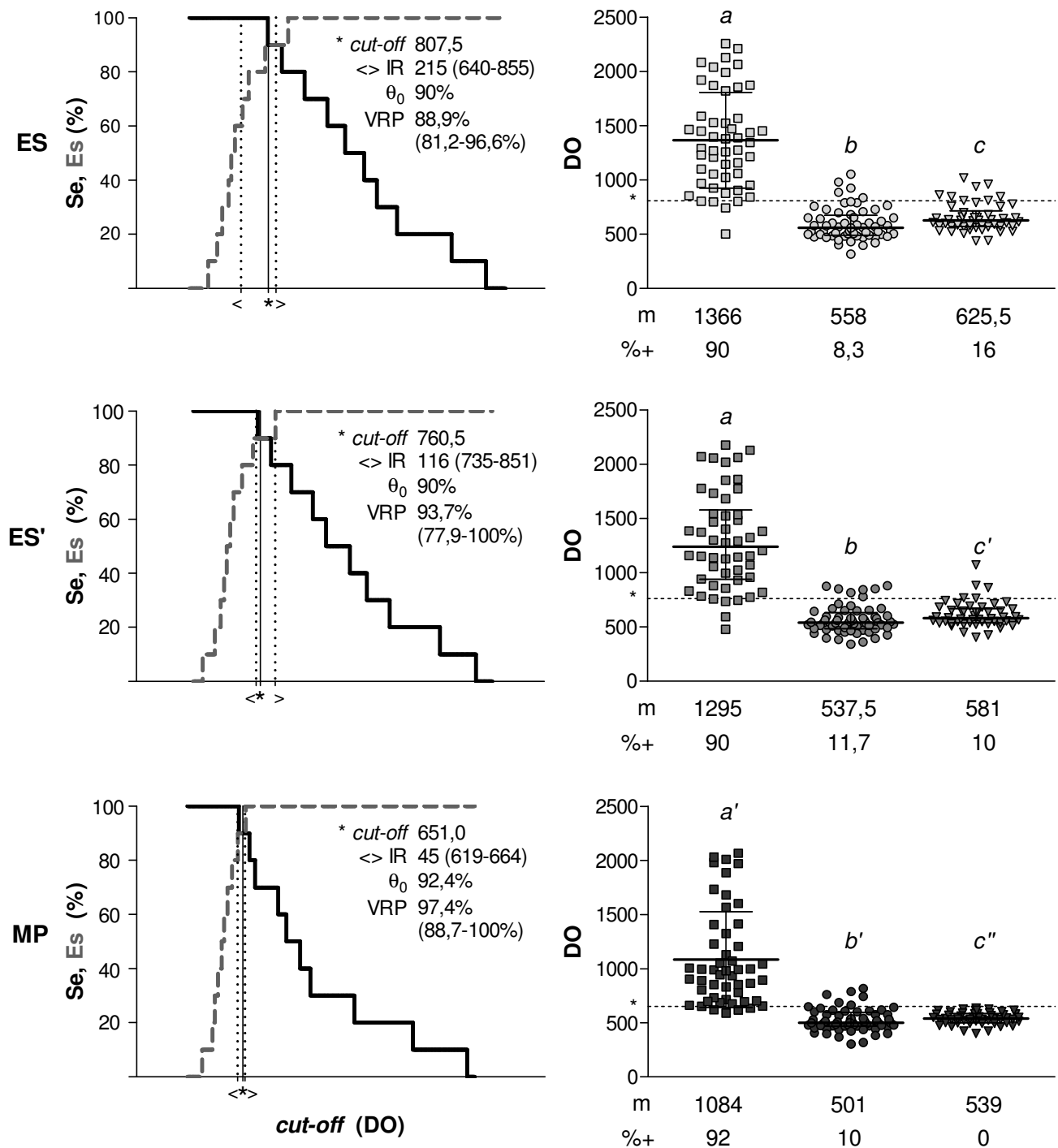


Figura 8. Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (G1 □ ; n = 50), outras infecções parasitárias (G2 ○ ; n = 60) e indivíduos saudáveis (G3 ▽; n = 50) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) com utilização de extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e tratado com tampão ácido (ES') – controle ou oxidado com metaperiodato de sódio para deglicosilação (MP). *Two-graph receiver operating characteristic curve* (TG-ROC) com dados de cut-off (*), *intermediate range* (IR, <>; com limites inferior e superior), θ_0 – ponto de cruzamento das curvas de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) e *valid range proportion* (VRP; 95% intervalo de confiança). *Scatter plots* com média da densidade ótica (DO) e positividade (%+) segundo o cut-off selecionado (linha tracejada); letras acompanhadas de linhas (') indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre níveis de IgG anti-*Strongyloides* no mesmo grupo amostral (G1 – ANOVA para medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni, G2 e G3 – Teste de Friedman seguido de comparações múltiplas de Dunn). Barras – G1 – média (m) com desvio padrão; G2 e G3 – mediana (m) com intervalo interquartil.

4.2.4 Detecção de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-ES e -MP

Com objetivo de traçar o perfil de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), na resposta contra antígenos com e sem presença de carboidratos detectáveis, foram realizadas reações com ES e MP. Conforme resultado de IgG (Figura 8), os grupos testados tiveram a redução da DO de IgG no ELISA-MP, em comparação com o ES. Como para IgG, as subclasses também tiveram menor ligação ao preparado antigênico com carboidratos degradados quimicamente, o que resultou em diferenças de DO.

Aplicando *two-way* ANOVA para medidas repetidas em cada grupo, houve interação entre os fatores antígeno (ES e MP) e subclasse de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) apenas no G1 ($F = 3,22$, $P = 0,02$) (Figura 9). A redução da DO foi significativa para os quatro isotipos de IgG, com destaque para IgG3 (-74,36; 95 % IC -103,30 a -45,45, $P < 0,0001$) e IgG1 (-51,30, 95 % IC -80,21 a -22,39, $P < 0,0001$) que tiveram as maiores reduções; IgG2 e IgG4 apresentaram diferenças de DO entre ES e MP em torno de $< -30,50$ (IgG2 -31,46, 95 % IC -60,37 a -2,55, $P = 0,0269$; IgG3 -30,50, 95 % IC -59,49 a -1,667, $P = 0,0335$). Em G2 e G3 não houve interação entre o conjunto de dados dos antígenos e as subclasses, as diferenças entre as DO nos ensaios ELISA-ES e ELISA-MP foram as mesmas para cada subclasse (Figura 9).

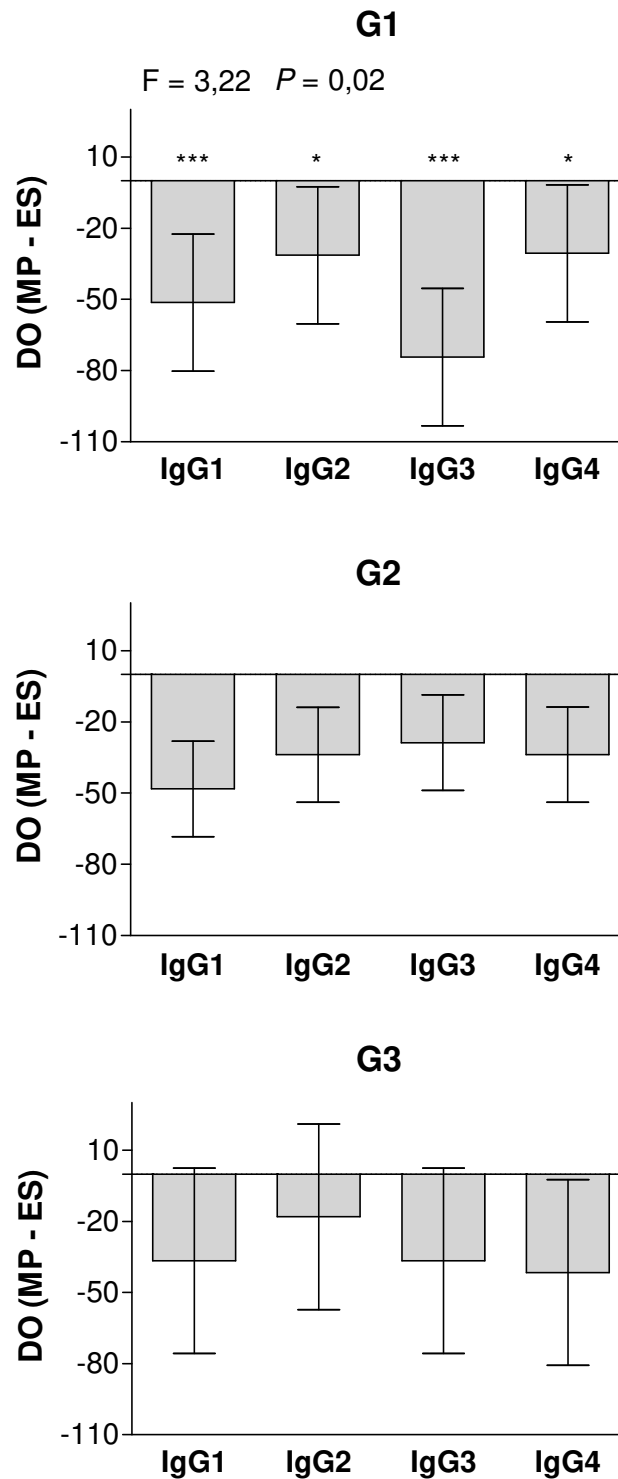


Figura 9. Diferença na detecção (densidade ótica, DO) das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes com strongiloidíase (G1, $n = 50$), outras infecções parasitárias (G2, $n = 60$) e indivíduos saudáveis (G3, $n = 50$), pelo método ELISA, utilizando extrato salino (ES) e antígeno deglicosilado com metaperiodato de sódio (MP) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*. Two-way ANOVA seguida de teste de comparação múltiplas de Šidák. Barras – média. Whiskers – intervalos de confiança 95%. * e *** – $P < 0,05$.

4.3

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LARVAS FILARIOIDES DE *Strongyloides venezuelensis* RECONHECIDAS POR IgG DE PACIENTES COM ESTRONGILOIDÍASE HUMANA POR TÉCNICAS PROTEÔMICAS

4.3.1 Obtenção das frações de *Strongyloides venezuelensis* após cromatografia de gel filtração

A cromatografia de gel filtração utilizando resina S-100 foi utilizada para fracionar o extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (ES) (Figura 10). Em cada tubo foi coletado, aproximadamente, 1 mL de amostra diluída em tampão, sendo esses lidos por espectrofotometria a 595 nm, após dosagem por Bradford (1976). A Figura 10 representa o cromatograma do ensaio realizado com pico de absorbância. Definiu-se o intervalo dos tubos 10 a 68 para verificação do fracionamento.

Os perfis eletroforéticos das frações contidas nos tubos foram analisados, após SDS-PAGE 13% e coloração por nitrato de prata (Figura 11). Foram visualizados componentes proteicos no ES por toda extensão do gel, com massas moleculares aparentes variando de ≤ 8 a ≥ 140 kDa (Figuras 11 e 12). Bandas individualizadas ou grupos polipeptídicos foram revelados nas regiões de ≤ 8 , 9, 10-10,5, 11-11,5, 13,5, ≤ 15 -, 18, 19-26, 30-34, 37, 45, 47, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 86, 95, 100 e ≥ 140 kDa. As frações foram definidas e reunidas, com base no perfil eletroforético, como segue: F1 – tubos 22 e 23, F2 – 34 ao 38, F3 – 42 ao 46 e F4 – 50 ao 59 (Figura 12). Na F1 foi marcada uma região de alta massa molecular > 140 kDa. Em F2 os picos foram proeminentes em 13, 22, 25, 30, 33, 37, 45, 60, 70 e 140 kDa. A fração F3 teve bandas aparentes de ≤ 8 , 11, 13, 15, 16, 22, 30 e 60. Por fim, na porção F4 foram reunidos exclusivamente polipeptídeos de baixo peso molecular: ≤ 7 , 7,5, 9, 12,5-10 e 14 kDa (Figura 12).

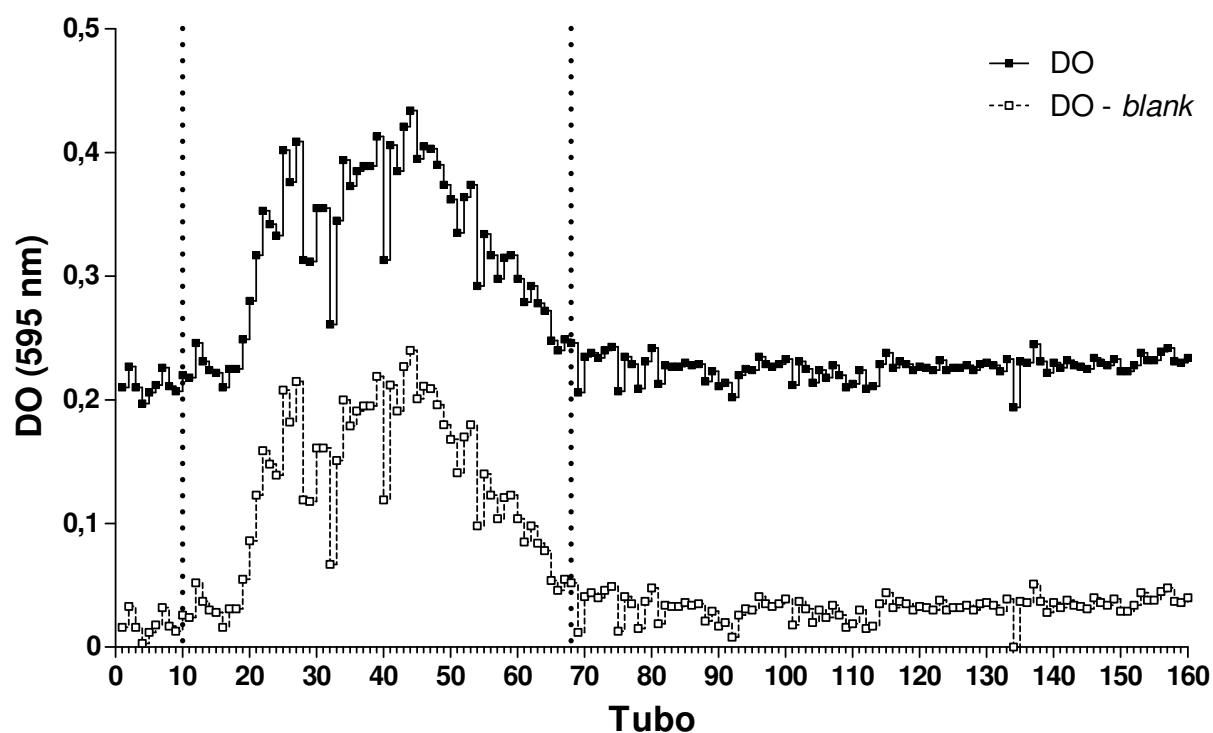


Figura 10. Perfil cromatográfico do extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). Leitura da densidade ótica (DO) a 595 nm após ensaio de Bradford (1976). Pico avaliado por eletroforese dos tubos 10 ao 68. *Blank* – tampão de equilíbrio.

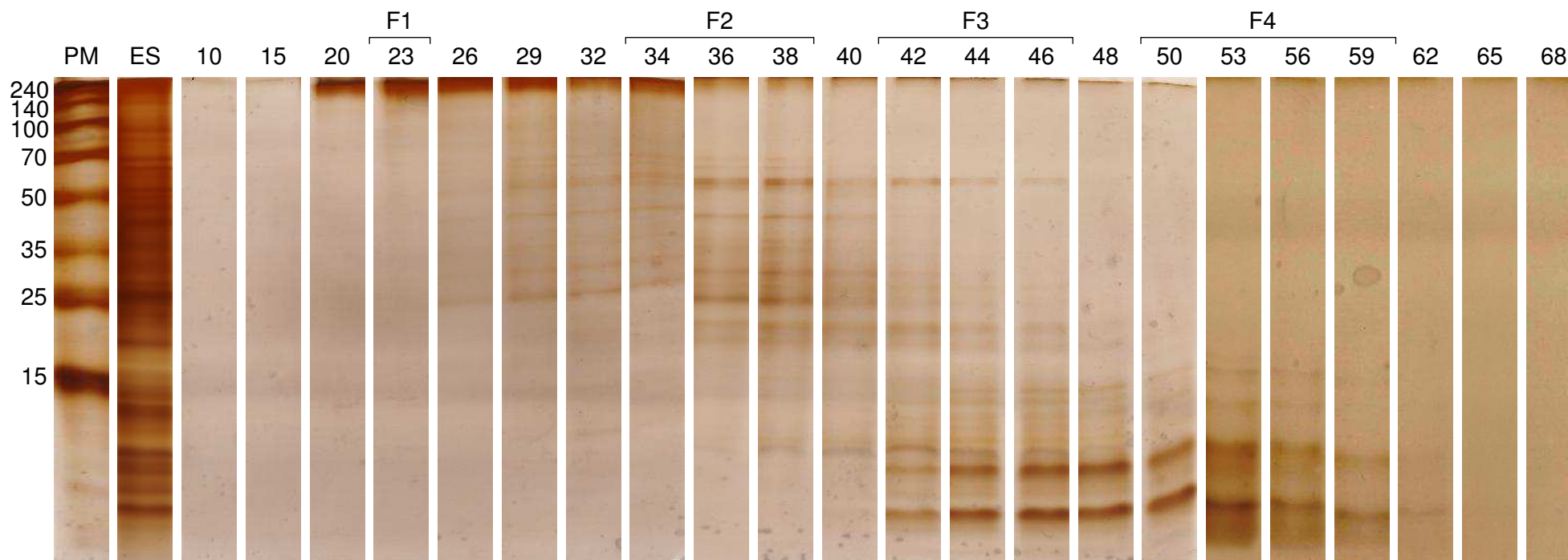


Figura 11. Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e amostras representativas das frações de 1 mL obtidas após cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). Números correspondem ao tubo coletado. Intervalo de análise do tubo 10 ao 68 definido de acordo com o cromatograma. SDS-PAGE 13% e coloração por nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

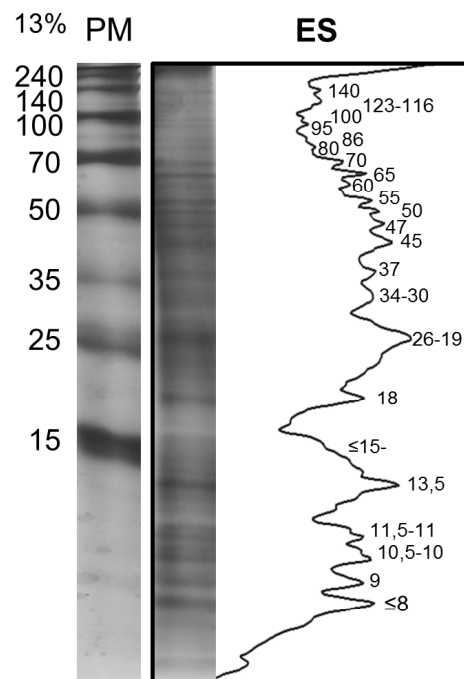
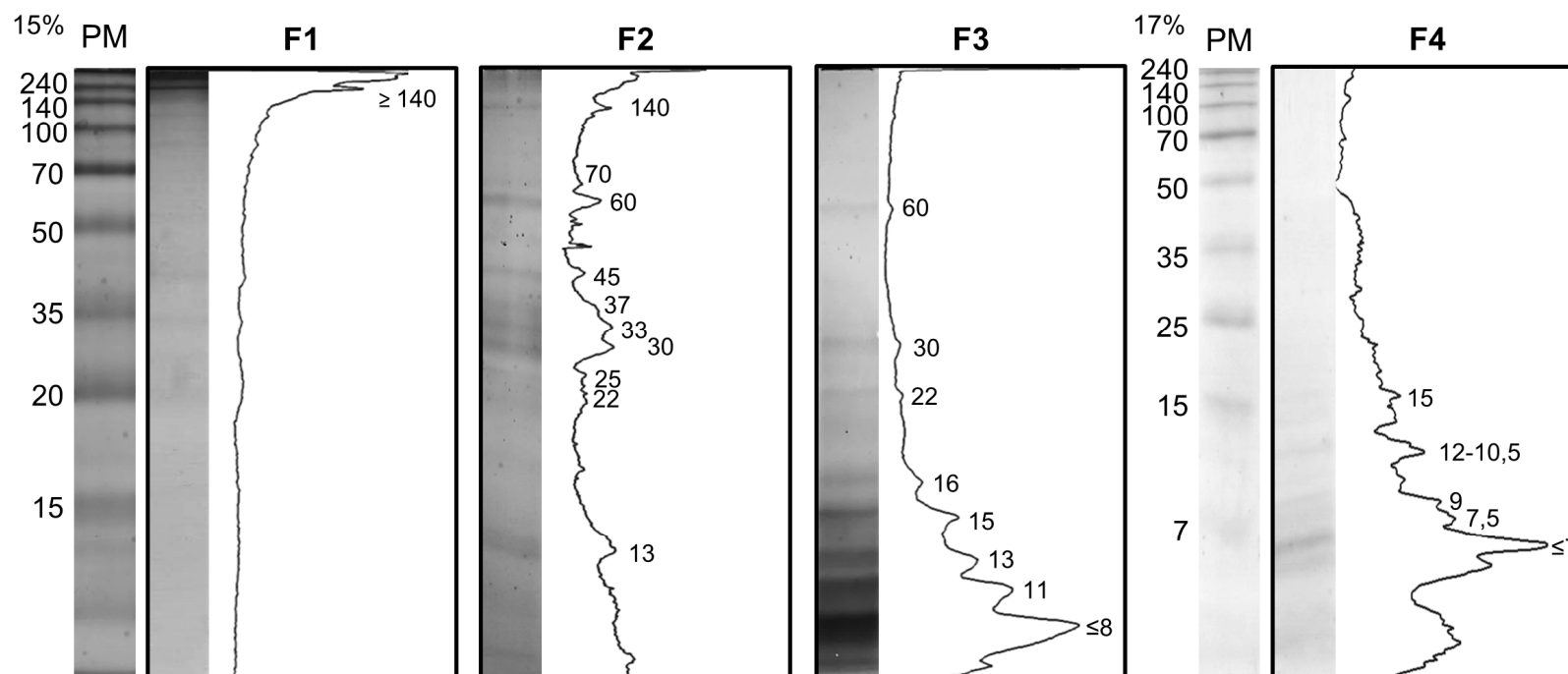


Figura 12. Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações obtidas após cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). Frações (F) definidas de acordo com o perfil observado nos tubos (Figura 11). F1 – tubos 22 e 23, F2 – 34 ao 38, F3 – 42 ao 46 e F4 – 50 ao 59. SDS-PAGE 13%, 15% e 17%, conforme indicação ao lado do padrão de massa molecular (PM) em kilodaltons (kDa). Coloração por nitrato de prata (ES, F1, F2 e F3) e azul de Coomassie (F4).



4.3.2 Detecção de IgG por ELISA utilizando ES e F1, F2, F3 e F4

Coordenadas das curvas ROC e TG-ROC possibilitaram uma combinação de parâmetros diagnósticos (Tabela 2 e Figura 13). A área sob a curva (AUC) mostrou que protocolos para detecção de IgG com as diferentes preparações antigênicas foram eficientes com $AUC > 0,900$ ($P < 0,001$), variando de 0,915 (F4) a 0,980 (F2). De acordo com o critério de corte estabelecido para o ES, na detecção de IgG sérica, a sensibilidade (Se) e especificidade (Es) foram de 94,0 % e 87,0%, respectivamente. A fração F2 manteve a Se, mas demonstrou aumento na Es para 93%. Razões de verossimilhança (LR) apresentaram os melhores valores de LR+ ($LR+ > 10$) para F2 ($LR+ = 13,43$); e de LR- ($LR- < 0,1$) para F2 ($LR- = 0,06$) e ES ($LR- = 0,07$) (Figura 13).

A tabela 2 apresenta os parâmetros diagnósticos obtidos com as curvas TG-ROC: θ_0 , *intermediate range* (IR) e *valid range proportion* (VRP). A análise dos dados conferiu valores altos de θ_0 , ponto de equivalência das curvas de Se e Es, para o ES ($\theta_0 = 94,0\%$) e F2 ($\theta_0 = 92,5\%$). Os valores de IR e VRP foram melhores para o teste ELISA-F2: estreito intervalo de pontos de *cut-off* para seleção e interpretação (IR = 23) e proporção de resultados válidos próxima de 100% (VRP = 98,9 (95 % IC = 89,7 – 100,0 %)). Para a fração F4, o resultado de θ_0 foi o menor ($\theta_0 = 83\%$); e F1 teve um amplo IR (767 (866 – 1633)) e baixa VRP (VRP = 66,5 % (95 % IC 27,0 – 93,6)).

Tabela 2. Parâmetros diagnósticos obtidos pelas curvas *two graph-receiver operating characteristic* (TG-ROC) para detecção de IgG em amostras de soro utilizando o extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100.

Extrato e frações	Parâmetros diagnósticos		
	θ_0 (%)	IR (limites superior e inferior)	VRP (%; 95 % IC)
ES	94,0	123 (508 – 631)	93,9 (81,7 – 100)
F1	88,0	767 (866 – 1633)	66,5 (27,0 – 93,6)
F2	92,5	23 (618 – 641)	98,9 (89,7 – 100,0)
F3	84,5	134 (346 – 480)	83,0 (60,4 – 95,0)
F4	83,0	102 (325 – 427)	85,7 (76,8 – 93,4)

IR – *intermediate range*. IC – intervalo de confiança. VRP – *valid range proportion*.

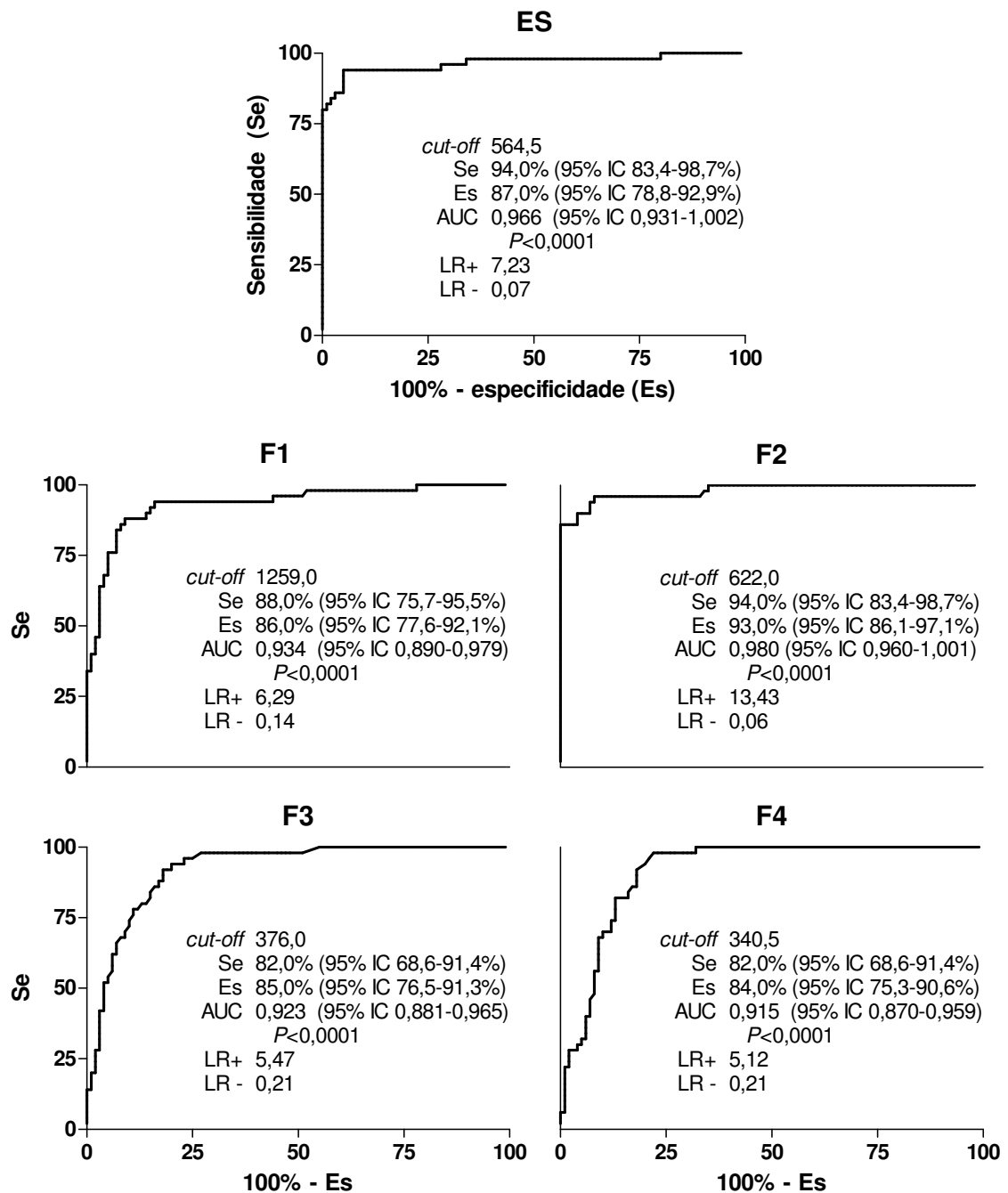


Figura 13. Curvas ROC indicando o *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*, AUC) (com os intervalos de confiança, IC) e *likelihood ratios* (LR+ e LR-) na detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro humano utilizando extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100.

Como apresentado na figura 14 todas as amostras foram testadas por ELISA utilizando ES e frações antigênicas (F1, F2, F3 e F4) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* obtidas por cromatografia de gel filtração S-100. As frações foram comparadas em relação ao ES (Figura 14). A média do IE no G1 foi maior para o ES, quando comparado às quatro frações ($P < 0,0001$), e F2 manteve a porcentagem de amostras IgG-positivas (94 %). No G2, enquanto F3 e F4 aumentaram a média do IE (F3 vs. ES - $t = 2,985$, $P = 0,0044$; F4 vs. ES - $t = 3,753$, $P = 0,0005$), F1 e F2 apresentaram diminuição do IE se comparado ao ES ($t = 5,152$, $P < 0,0001$; $t = 6,384$, $P < 0,0001$, respectivamente). A redução do IE foi acompanhada da redução de reatividade cruzada com amostras do G2 (F1 = 4 %), ou não detecção de IgG em pacientes com outras parasitoses (F2 = 0 %). A reatividade cruzada no ELISA-IgG no G2 ocorreu com amostras de *S. mansoni* (1/5 ES e F3), *E. vermicularis* (1/5 F1 e F4; 1/5 ES e F3), ancilostomatídeos (1/10 F1 e F4) e *A. lumbricoides* (1/10 F4). Nos pacientes saudáveis, G3, apenas F2 mostrou redução de IE estatisticamente significativa em relação ao ES ($t = 7,020$, $P < 0,0001$). A porcentagem de amostras positivas no G3 foi de 24% para ES e 14% para F2 (Figura 14).

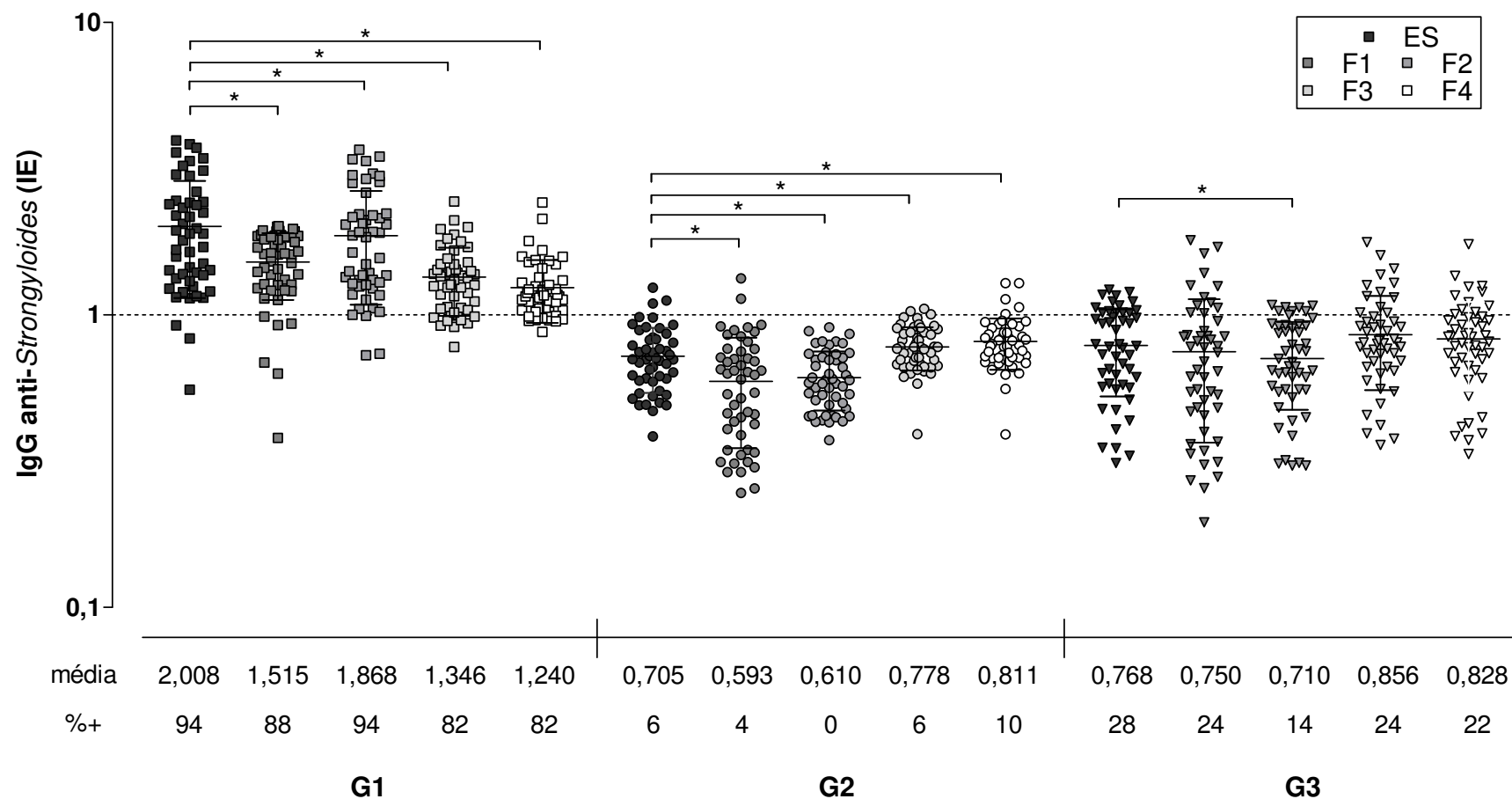


Figura 14. Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (G1; n = 50), outras infecções parasitárias (G2; n = 50) e indivíduos saudáveis (G3; n = 50) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) com utilização de extrato salino (ES) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e frações (F1-F4) obtidas por cromatografia de gel filtração em resina S-100. Resultados em índice ELISA (IE), plotados em escala logarítmica com média (barra) e desvio padrão (*whiskers*). Média de IE e positividade (%+) segundo o *cut-off* selecionado (linha tracejada, IE = 1). Significância estatística calculada por ANOVA e pós-teste t de Student pareado com correção de Bonferroni-Holm. (*P < 0,05).

4.3.3 Identificação dos peptídeos da fração F2 de *Strongyloides venezuelensis* por espectrometria de massa

Tabela 3. Caracterização de proteínas da fração F2, obtida por cromatografia de gel filtração em resina S-100, do extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* identificadas a partir de seus peptídeos por espectrometria de massa e inferidas pela busca em banco de dados para o gênero *Strongyloides*.

Banda ^a	Número de acesso ^b	Descrição	Score ^c	Únicos ^d	Peptídeos	Cobertura (%)	PSM ^e	Massa molecular (kDa)		pI
					Sequência			SDS-PAGE ^a	MS	
F2* ⁶⁰	238816835	aspartic protease 4 (ASP-4), <u>partial</u> <i>Strongyloides ratti</i>	79,84	6	AQVEAIQKFIGAEPLAR FIGAEPLAR GEYmVPcDK NGcQAIADTGTSLIAGPK TMAIQYGTGSMK YYTVDFGKDR	15,65 %	23	60	47,3	7,28
F2* ³³	584596240	14-3-3 zeta <i>Strongyloides ratti</i>	158,20	14	AGNPESKVFYLK AKLAEQAER DSTLImQLLR KVTEIGAELTNEER LAEQAER LAEQAERYDDmSLSmK LAEQAERYDDmSLSmKK mKGDYYR NLLSVAYK NLLSVAYKNVVGAR SGASNNSAVAYSEALEVAK TSLAPTHPVR VISSIEQK VTEIGAELTNEER	44,80 %	48	33	27,9	4,83
	224459125	HSP60 <i>Strongyloides ratti</i>	42,80	9	AAVEEGIVPGGGVALLR APGFGDNRK cLVLLSEK GYISPYFMNTSK LVQDVADKANEQAGDGTTCATVLAR NAGLEPASIVEK NTLKDIATGAK NVIIQSFGGPK VYANESVSFGYDALNDK	22,16 %	13	33	60,2	5,48

^a Conforme apontado na figura 12.

^b Banco de dados de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c As plataformas de busca atribuem pontuações que refletem semelhança entre o espectro de fragmentação experimental (medido) e os espectros teóricos dos peptídeos de uma dada base de dados (GRANHOLM; KÄLL, 2011).

^d Peptídeo único é definido como um peptídeo, independente do seu comprimento, que existe apenas em uma proteína de um proteoma de interesse, mesmo este peptídeo apareça mais do que uma vez na mesma proteína (ZHAO; LIN, 2010).

^e *Peptide spectra match* (PSM) é um possível, conforme escores estatísticos, peptídeo identificado por MS e correspondente à determinada proteína. Resultante da relação entre os espectros experimentais e teóricos (GRANHOLM; KÄLL, 2011).

pI – ponto isoelétrico.

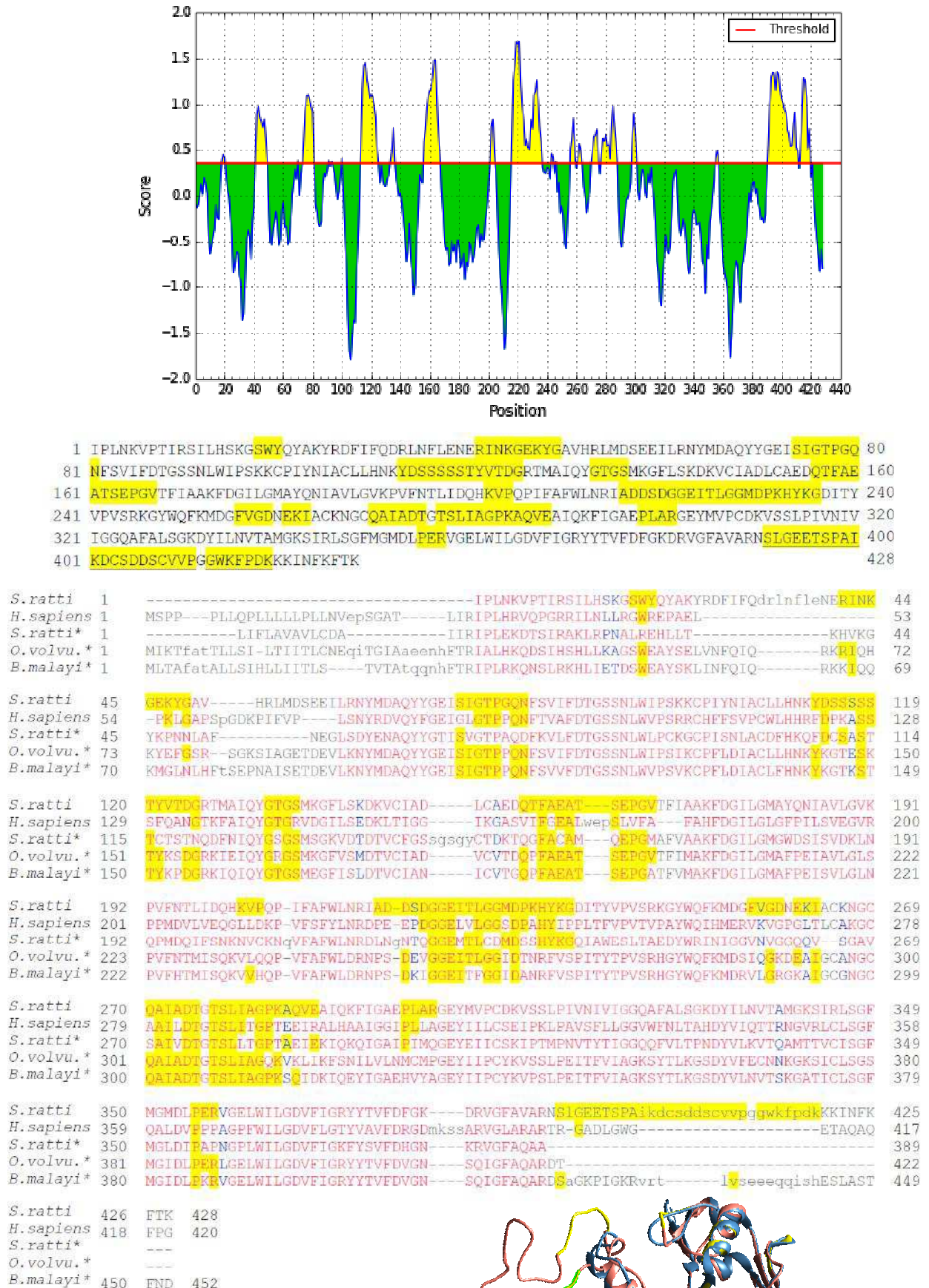


Figure 15. A. ASP-4
Legenda p. 86

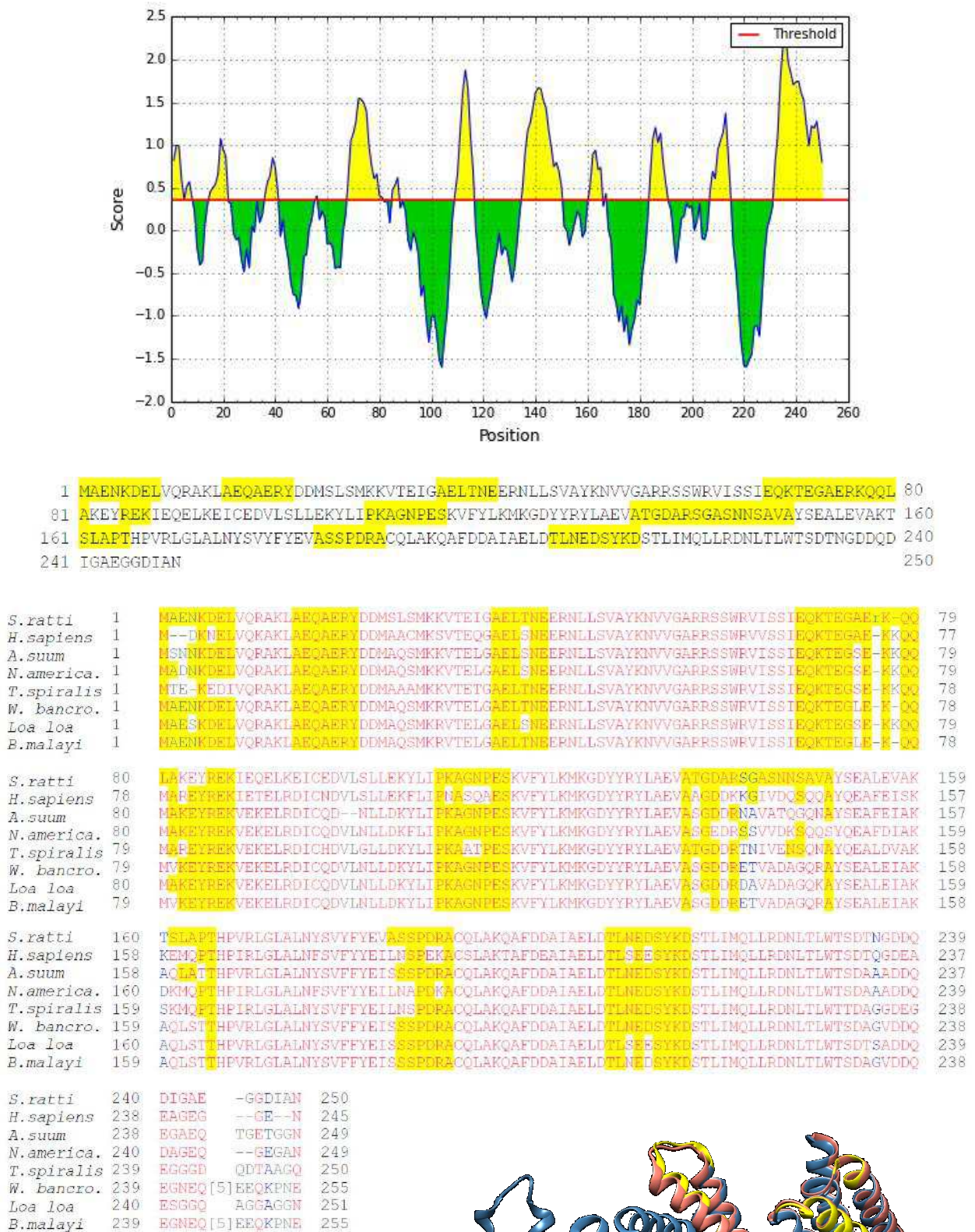


Figura 15. B. 14-3-3 zeta.
 Legenda p. 86

1	MLRLAAHNFESKSIIRSYAKDLKFGADGRKAMLVGVLDLADAVSVTMGPGRNVIEQSFGGPKITKDGVTAKAIDLEDK	80
81	YQNMGAQLVQDVADKANEQAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKKMSKQVTTPEEIA	160
161	QVATISANGDKDIGKLISEAMKKVGNKGVTITVKDGKTLDDLELEIEGKMFDRGYISPYFMNTSKGKCKFEKCLVLLSEK	240
241	KISQVQDIVPALELANKYRQPLIIIAEDVDGEALTTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLKDIAIATGAKVFGDES	320
321	NLHKLEDIQAGDFGEVAEVTVTKDDTLMLNGKDAEQVEKRIQQIEFEIEQSTSEYEKEKLNERLAKLSKGVAVLKIGGA	400
401	SEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQPISTIIKNAGLEPAS	480
481	IVEKVYANESVSFGYDALNDKFVDMIQGTGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKETPAPPMGGMGGMG	560
561	GGMF	564
<i>S.ratti</i>	1 MLRLAA---HNFESKSI-----IRSYAKDLKFGADGRKAMLVGVLDLADAVSVTMGPGRNVIEQSFGGPKITKDG	68
<i>S.ratti</i>	1 MLRLAA---HNFESKSI-----IRSYAKDLKFGADGRKAMLVGVLDLADAVSVTMGPGRNVIEQSFGGPKITKDG	68
<i>H.sapiens</i>	1 MLRLPTvfqmrPVSRVLaphl---TRAYAKDVFGADARALMLQGVLDLADAVAVTMGPGRNTVIIEQSWGSPKVTKDG	77
<i>A.duodena</i>	1 MLRLAR---SSITRNL-----VRNYAKDKIFGAEGRKAMLVGVLDLADAVSVTMGPGRNVIEQSWGSPKVTKDG	68
<i>O.volvulus</i>	1 M-----TNVVVSFEQLQQAFFREVAVIDSTVAVTAGPFGKTVGINKPYGAFETTKDG	52
<i>B.malayi</i>	1 MFRIGG-----QSVALRVsrtvqsgLRHYAKDVKFGADGRASMLYGVDTLADAVAVTMGPGRNVIEQSWGSPKVTKDG	75
<i>T.trichiu</i>	1 -----ma-----AKDVKEGNDARVKMLRGVNVLDADAVKVLTPKGRNVVLDKSEGAFTITKDG	53
<i>S.ratti</i>	69 VTAKAIDLEDKYNMGAQLVQDVADKANEQAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKK	148
<i>S.ratti</i>	69 VTAKAIDLEDKYNMGAQLVQDVADKANEQAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKK	148
<i>H.sapiens</i>	78 VTAKSIDLKKYKNIKAKLVQDVANNITNEEAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKK	157
<i>A.duodena</i>	69 VTAKAIDLKKYKNIKAKLVQDVANNITNEEAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKK	148
<i>O.volvulus</i>	53 YKVMGKIKPEKPLNAAITSIQAQSCSQNDKVGDTITCSILTSGMIVEASKSIAAGNDRISIKNGMQAKDVVLVEVAS	132
<i>B.malayi</i>	76 VTAKAIDFKDKYKNIKAKLVQDVANNITNEEAGDGTTCATVLARAIKEGFESISRGANPIEVRKGMSSVEAIVEELKK	155
<i>T.trichiu</i>	54 VSVAREIELEDKFNMGAAQMVKEVASKANDAGSDGTTCATVLAQAIITEGLKAVAAGMNPMDLKRGIKAVTAAVEELKA	133
<i>S.ratti</i>	149 MSKQVT--TPEEIAQVATISANGDKDIGKLISEAMKKVGNKGVTITVKDGK--TLDDLELEIEGKMFDRGYISPYFMNTSKG	225
<i>S.ratti</i>	149 MSKQVT--TPEEIAQVATISANGDKDIGKLISEAMKKVGNKGVTITVKDGK--TLDDLELEIEGKMFDRGYISPYFMNTSKG	225
<i>H.sapiens</i>	158 QSKPVT--TPEEIAQVATISANGDKDIGKLISEAMKKVGNKGVTITVKDGK--TLDDLELEIEGKMFDRGYISPYFMNTSKG	225
<i>A.duodena</i>	149 QSKPVT--TPEEIAQVATISANGDKDIGKLISEAMKKVGNKGVTITVKDGK--TLDDLELEIEGKMFDRGYISPYFMNTSKG	224
<i>O.volvulus</i>	133 MARTISleKIDVAVQVATISANGDRSIGSNIAADAVKVGKGVITVEESKqSKELEVELTTGMOFDRGYLSPYFITNNEK	212
<i>B.malayi</i>	156 MSKQVT--TPEEIAQVATISANGDRSIGSNIAADAVKVGKGVITVEESKqSKELEVELTTGMOFDRGYLSPYFITNNEK	232
<i>T.trichiu</i>	134 LSVPCS--DSKATQVGTISANSDETGVKGLIAEAMDKVGEKGVITVEDGT--GLQDELDDVEGMOFDRGYLSPYFITNNEK	210
<i>S.ratti</i>	226 GKCFEKLCLVLLSEKKISQVQDIVPALELANKYRQPLIIIAEDVDGEALTTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	305
<i>S.ratti</i>	226 GKCFEKLCLVLLSEKKISQVQDIVPALELANKYRQPLIIIAEDVDGEALTTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	305
<i>H.sapiens</i>	235 QKCEFDQDAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANHRKPLVITAEVDGEALSTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	314
<i>A.duodena</i>	226 AKVEFEKALVLLSEKKISQVQDIVPALELANKYRQPLIIIAEDVDGEALTTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	305
<i>O.volvulus</i>	213 MIVELDDPYLLITEKKLNIIQPLLSILEAVVKGSKPLLIIEDEGEALSTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	292
<i>B.malayi</i>	233 AKVEFEKCLLLSEKKISQVQDIVPALELANKYRQPLIIIAEDVDGEALTTVLNRLKVLQVCAVKAPGFGDNRRKNTLK	312
<i>T.trichiu</i>	211 GAVELSPFILLADKKISNIREMLPVLEAVAKAGKPLIIIAEDVEGEALATLVVNTMRGIVKVAAVKAPGFGDNRRKNTLK	290
<i>S.ratti</i>	306 DIAIATGAKVFGDESNLHKLEDIQAGDFGEVAEVTVTKDDTLMLNGKDAEQVEKRIQQIEFEIEQSTSEYEKEKLNERL	385
<i>S.ratti</i>	306 DIAIATGAKVFGDESNLHKLEDIQAGDFGEVAEVTVTKDDTLMLNGKDAEQVEKRIQQIEFEIEQSTSEYEKEKLNERL	385
<i>H.sapiens</i>	315 DMAIATGGAVFGDEGLTLNLEDVPHDLKVGVEVITKDDAMLLKKGSDKAKIEKRIQIEIEQDLVTTSEYEKEKLNERL	394
<i>A.duodena</i>	306 DMAIATGGVTFGDDSNLVKLEDQLSDGFEVEVNTIKDDTLILLRGGDAEIEKRIQIDQADEIEQSTSEYEKEKLNERL	385
<i>O.volvulus</i>	293 DIAALTNKAYVIKDELGIKMEDLTLEDLAIKANKVITIKONTTIVSENVTDRVKARIEQISQIESSTSDYQKEKLNERL	372
<i>B.malayi</i>	313 DMAIATGGVTFGDDANLLKIEDVQISDLGAEVSVITKDDTLILRGGKPKDLEKRISMIEDELEQSTSEYEKEKLNERL	392
<i>T.trichiu</i>	291 DIATLTGGTVISEE--IGMELEKATLEDLQAKRVVINKDDTTIIDGVGEAAIQGRVAQIRQQIEATSDYDREKIQERV	369
<i>S.ratti</i>	386 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	465
<i>S.ratti</i>	386 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	465
<i>H.sapiens</i>	395 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	474
<i>A.duodena</i>	386 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	465
<i>O.volvulus</i>	373 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	452
<i>B.malayi</i>	393 AKLSKGVAVLKIGGASEVEVSEKDRVTDALCATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	472
<i>T.trichiu</i>	370 AKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATRAAVEEGIVPGGGVALLRAVKVLDNIKVGNSDQELGVRIVQKAVRQ	449
<i>S.ratti</i>	466 PISTIIKNAGLEPASIVEKVYANESVSFGYDALNDKFVDMIQGTGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	545
<i>S.ratti</i>	466 PISTIIKNAGLEPASIVEKVYANESVSFGYDALNDKFVDMIQGTGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	545
<i>H.sapiens</i>	475 PAMTIAKNACVSGSLIVEKIMQSSS--EVGYDAMAGDFVMVEKGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	545
<i>A.duodena</i>	466 PICTIVRNAGIESSSIVEKVLANSNIGFVYDALNDKFVDMIEAGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	553
<i>O.volvulus</i>	453 PIKRLVKNAGLESAVIIDYLIKQNNKELIYNVEAMSYANAFAGVIDPAKVVRIFAETASVAVSLITTESMIVDIPNKD	532
<i>B.malayi</i>	473 PIMTIVRNAGVDPSSVVEKVLASSELPGFYDALNDKFVDMIEAGIIDPTKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	552
<i>T.trichiu</i>	450 PLRQIVLNCGEPSVVANTVKGGDG--NYGYNAATEEYGNMIDMGILDPKVVRTSLQDAAGVASLLATTECVVTEVPKET	528
<i>S.ratti</i>	546 P--APP--CGMGCMGGMGGGMF	564
<i>S.ratti</i>	546 P--APP--CGMGCMGGMGGGMF	564
<i>H.sapiens</i>	554 KdPGMGAmGGMGGMGG---GMF	573
<i>A.duodena</i>	546 P--APP--CGMGCMGGMGGGMF	566
<i>O.volvulus</i>	533 EnASPM---GAGNGRMND--F	550
<i>B.malayi</i>	553 PqMAAGMGGMGGGMGG---MY	574
<i>T.trichiu</i>	529 A--ADLGA--AGMGCMGGMGGMM--	548

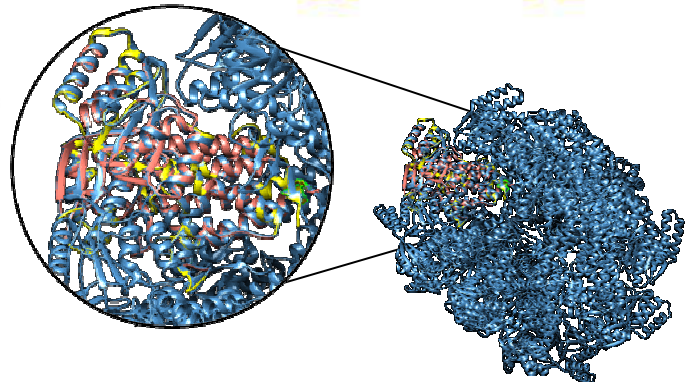


Figura 15. C. HSP60
Legenda p. 86

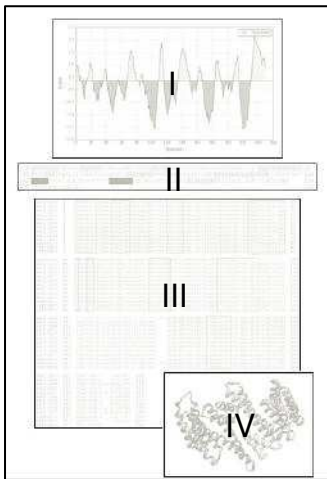


Figura 15. I. Predição de epítomos lineares de células B pelo BepiPred. Resíduos de aminoácidos são coloridos em amarelo no gráfico quando atingem escores acima do limiar (*threshold*), onde eixo X corresponde às posições dos resíduos na sequência (*position*) e eixo Y *score*.

II. Marcação dos determinantes antigênicos (amarelo) preditos para células B na sequência da proteína. Sequência sublinhada não presente no modelo tridimensional.

III. Alinhamento das sequências de aminoácidos de membros da família da proteína. Marcação em amarelo indica aminoácidos idênticos às proteínas de *Strongyloides ratti* compartilhados entre as sequências analisadas. O tracejado representa intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento. Conservação da sequência de resíduos: conservados (vermelho), colunas sem (azul) ou com (cinza; < 50 % – maiúscula, > 50 % - minúscula) *gap*. COBALT. Abaixo detalhamento do número de acesso.

IV. Vista em *cartoon* da estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa, da estrutura terciária colorida de acordo com os epítomos preditos. UCSF Chimera.

A. ASP-4. aspartic protease 4, partial [*Strongyloides ratti*]

ACR56788.1, aspartic protease 4 [*Strongyloides ratti*]; O96009.1 aspartyl protease 4 [*Homo sapiens*]; *ACR56787.1 aspartic protease 3 [*Strongyloides ratti*]; *KHN83855.1 aspartic protease 3; *O96906, aspartic protease [*Onchocerca volvulus*]; *Q8MY58, aspartic protease BmAsp-2 [*Brugia malayi*].

*Comparadas por estarem no mesmo clado (MELLO et al., 2009).

B. 14-3-3 zeta. 14-3-3 zeta [*Strongyloides ratti*]

AHJ11165.1, 14-3-3 zeta [*Strongyloides ratti*]; NP_663723.1, 14-3-3 protein zeta/delta [*Homo sapiens*]; AHJ11136.1, 14-3-3 zeta [*Ascaris suum*]; AHZ60123.1, 14-3-3 zeta isoform 1 [*Necator americanus*]; AHJ11172.1, 14-3-3 zeta [*Trichinella spiralis*]; AHJ11167.1 14-3-3 zeta [*Wuchereria bancrofti*]; AHJ11161.1, 14-3-3 zeta [*Loa loa*]; AHJ11138.1, 14-3-3 zeta [*Brugia malayi*].

C. HSP60. HSP60 [*Strongyloides ratti*]

Gráfico de I não apresentado.

ACN43305.1, HSP60 [*Strongyloides ratti*]; ABY65231.1, HSP60 [*Strongyloides ratti*]; P10809.2, HSP-60 [*Homo sapiens*]; AGX00997.1, heat shock protein 60 [*Ancylostoma duodenale*]; CAA70570.1, heat shock protein 60 [*Onchocerca volvulus*]; ACY25666.1, chaperonin-like protein HSP60 [*Brugia malayi*]; CDW56974.1, Mitochondrial chaperonin hsp60 [*Trichuris trichiura*]

5. DISCUSSÃO

5.1

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS COM POTENCIAL USO NO SORODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE

O fracionamento parcial de extratos antigênicos de *Strongyloides* com técnicas cromatográficas compreende estudos com: gel filtração em resina S-200 (MANGALI et al., 1991), interação hidrofóbica em octil-Sepharose (RIGO et al., 2008) e interação por afinidade de carboidratos em resina concanavalina-A-agarose (GONZAGA et al., 2011a). O presente estudo foi o primeiro a recorrer a cromatografia de troca iônica para a obtenção de frações potencialmente aplicáveis no diagnóstico da strongiloidíase.

Os perfis eletroforéticos das frações DEAE S1 e S2 apresentaram perfis complementares, quando comparados ao ES. Na fração DEAE S1, foi observado um enriquecimento de proteínas de baixo peso molecular, incluindo polipeptídeos de < 15 a 21 kDa, indicando que essas moléculas não interagiram com a resina DEAE. DEAE S2 é principalmente composta de proteínas de 21 a 50 kDa, que interagiram fortemente com o grupo dietilaminoetil. Esse reconhecimento apontou que as proteínas de DEAE S2 apresentaram carga líquida negativa sob condições de pH fisiológico.

A resina com DEAE foi aplicada como um primeiro passo de fracionamento do extrato larval de *S. venezuelensis* para a avaliação de protocolos de ELISA. Apesar de ter parâmetros diagnósticos menores, a fração DEAE S1 incluiu regiões de proteínas imunodominantes descritas por outros autores. A região de 10-30 kDa (RIGO et al., 2008) e a banda de 28 kDa (FELICIANO et al., 2010) de preparações larvais de *S. venezuelensis* foram detectadas por IgG de pacientes infectados, mesmo após diferentes fracionamentos com detergentes. Outros estudos demonstraram reatividade sérica com bandas proteicas de 10, 17 e 19 kDa (ATKINS et al., 1999; SILVA et al., 2003).

Estudos anteriores que empregaram antígenos homólogos ou heterólogos de *Strongyloides* mostraram reatividade de soro em uma região proteica comparável àquela obtida neste trabalho, especialmente, em DEAE S2. Machado e colaboradores (2008b) identificaram, em *immunoblot* para detecção de IgG, uma fração antigênica imunodominante de 45 kDa do extrato de *S. venezuelensis*. Em relação a *S. stercoralis*, a reatividade de IgG contra bandas de 21, 26, 31, 32 e 33 kDa (SATO et al., 1990; ATKINS et al., 1999; SUDRÉ et al., 2007) já foi demonstrada. Ainda que a mobilidade eletroforética similar não caracterize uma medida absoluta da identidade polipeptídica (GOMEZ-MUÑOZ; CUQUERELLA; ALUNDA, 1996) sugere-se que essas bandas descritas sejam equivalentes às encontradas e que a fração DEAE S2, parcialmente purificada, possa ser relevante no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Resultados falso-negativos (4 pacientes, 8 %) no ELISA-DEAE S2 poderiam ser explicados em razão do fato de esses pacientes não terem atingido níveis detectáveis de anticorpos. O grupo de pacientes com outras infecções parasitárias (G2) é representativo da população em geral, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes (GROVE, 1996; CDC, 2012). No G2, casos de reatividade cruzada ocorreram em pacientes infectados com ancilostomatídeos, que resultaram em falsos-positivos no ES e em DEAE S1. Ancilostomatídeos são um dos principais responsáveis pela reatividade cruzada na sorologia para estrogiloidíase. A positividade de soros de indivíduos saudáveis (G3), com níveis detectáveis de IgG, poderia ser explicada pela residência em área endêmica com constante exposição antigênica. Os resultados positivos em G2 e G3, possivelmente, são de indivíduos com histórico de estrogiloidíase não registrado, de casos assintomáticos crônicos ou outros não detectados no momento da coleta da amostra e, de tal modo produziram anticorpos anti-*Strongyloides*.

A composição diferencial das frações DEAE S1 e DEAE S2 afetou a *performance* do ELISA. O uso de DEAE S2 contribuiu para um aumento na detecção de IgG no G1 com a seleção de epítomos mais sensíveis e com decréscimo na mediana dos outros grupos. Análises das curvas ROC e TG-ROC forneceram um *cut-off* ótimo para cada fração antigênica estudada. Dados dos ensaios ELISA mostraram um perfil de detecção diferente de

IgG. Parâmetros diagnósticos da DEAE S1 foram inferiores, se comparados com aqueles de DEAE S2, a qual exibiu sensibilidade e especificidade aumentadas e maior valor de AUC. Desta forma, é sugerido que diferentes epítomos foram reconhecidos (ATKINS et al. 1999; GONZAGA et al. 2011a). IgG, possivelmente, tem maior afinidade por epítomos proteicos com resíduos aniônicos, uma vez que a resina DEAE é positivamente carregada. De acordo com Jaeschke e colaboradores (1994), valores de LR+ maiores que 10, praticamente, confirmam o diagnóstico, e LR– menores que 0,1 excluem o diagnóstico. As LRs apresentadas pela fração DEAE S2 tiveram uma *performance* diagnóstica considerável na detecção de IgG em pacientes com *estrongiloidíase* com valores iguais a LR+ = 10,73 e LR– = 0,09.

Um passo simples de fracionamento parcial, como conseguido com a cromatografia de troca-aniônica com DEAE, também apresentou resultados significativos em imunoenaios para detecção de anticorpos na filariose por *Wuchereria bancrofti* (CHENTHAMARAKSHAN; REDDY; HARINATH, 1996) ou para a localização de antígenos fracionados na infecção por *Paragonimus* sp. (LEE; CHUNG, 2001); e ainda para purificação de tubulina de *Trichinella spiralis* (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-CAABEIRO, 1998). Referente ao diagnóstico, a fração de antígeno heterólogo que não interagiu com a resina DEAE registrou melhores resultados na detecção de IgG na filariose bancroftiana (CHENTHAMARAKSHAN; REDDY; HARINATH, 1996), em contraposição com os resultados obtidos para a *estrongiloidíase*.

A caracterização imunoquímica detalhada da fração DEAE S2 pode ser considerável com a utilização de outras técnicas, por exemplo, o fracionamento sequencial em cromatografias de gel filtração, como previamente aplicado para fins diagnósticos em outras infecções parasitárias (DE GRAAF et al., 1993; CAMARGO et al. 2004; REVILLA-NUÍN et al., 2005; KAUSHAL et al., 2009). No entanto deve-se considerar que um alto nível de purificação de antígenos parasitários pode ser relacionado a um aumento de especificidade acompanhado de redução nos índices de sensibilidade (CHENTHAMARAKSHAN; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001). Assim, uma fração antigênica definida, como a DEAE S2, que contém mais polipetídeos antigênicos, pode garantir um sistema de ELISA apropriado.

Não obstante, a fim de garantir uma fração mais purificada e com manutenção de elevado reconhecimento por anticorpos específicos, seria interessante a utilização de técnicas de separação sequenciais. Esse arranjo em série foi empregado para purificações de componentes metabólicos de outras espécies de helmintos, como *Fasciola hepatica* (McGONIGLE; DALTON, 1995; AMLABU; NOK; SALLAU, 2009); porém foi pouco utilizado para purificações antigênicas com propósitos diagnósticos em infecções humanas, com exemplos descritos em parasitos de interesse veterinário (GOMEZ-MUÑOZ; CUQUERELLA; ALUNDA, 1996; REVILLA-NUÍN et al., 2005). Entretanto, mesmo com esse objetivo, não foi possível o fracionamento sequencial do ES de *S. venezuelensis*. A manipulação de extratos proteicos de helmintos é intrincada, e cada passo experimental envolve perda de massa proteica, o que dificultou a obtenção de concentração de entrada suficiente para a cromatografia de gel filtração. Deste modo, optou-se por preservar massa e volume de lotes de partida de ES e fracionar, separadamente, pelas duas técnicas, a já discutida e a de gel filtração.

5.2

CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DEGLICOSILADAS DE *Strongyloides venezuelensis* NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA

No presente estudo, a deglicosilação química, pelo metaperiodato de sódio, de larvas filarioides de *S. venezuelensis* e seu extrato salino total, foi útil para investigar histo- e quimicamente alterações no conteúdo de carboidratos, caracterização do perfil eletroforético e para avaliar a detecção de IgG e respostas das subclasses na estrongiloidíase humana.

Larvas íntegras, tratadas ou não com MP, apresentaram coloração diferencial com solução de cloreto de zinco iodado e reagente de Fehling. As colorações com PAS, azul de alcião e solução de Lugol não foram diferentes entre os tratamentos, mas as marcações

foram positivas. A técnica de PAS, por ter no protocolo um passo com ácido periódico, funcionou como coloração controle da oxidação dos carboidratos. Azul de alcião e Lugol, apesar da seletividade de coloração para carboidratos, dependem de diversas condições técnicas, mas o mecanismo de interação desses corantes com o espécime biológico não era do escopo deste estudo.

Trabalhos que buscaram caracterizar histoquimicamente nematódeos são restritos, e as várias técnicas de coloração descritas e/ou revisadas focam na discussão com fins de diagnóstico diferencial. Porzecanski (1941 apud KILEJIAN; SAUER; SCHWABE, 1962) reportou que a parede do cisto hidático de *Echinococcus granulosus* contém polissacarídeos, que são Fehling- e Benedict-negativos. *Rhabditis monhyster* teve o corpo corado com reagente de Fehling (COBB et al., 1914). A coloração amarelada por cloreto de zinco nas extremidades das larvas de *S. venezuelensis* tratadas com MP deve ser interpretada com cuidado, uma vez que as variações do amarelo em preparações com iodo não são vinculadas a um grupo de carboidratos específico marcado (LOCQUIN; LANGERON, 1983). As estruturas internas das larvas mantidas em PBS são claramente positivas para Fehling, com evidente precipitação de óxido cuproso marrom, enquanto, nas MP, apenas a cutícula foi visualizada. A maior evidência do esôfago e intestino e a mudança no padrão de coloração da cutícula usando reagente de Fehling; e a clara marcação da cutícula larval nos outros testes histoquímicos sugere que os as substâncias glicídicas cuticulares não são facilmente oxidáveis. Apesar disso, componentes da cutícula são pouco solúveis em PBS e constituem parte mínima nos extratos solúveis em tampões salinos. Assim, esses testes, mesmo com metodologia clássica, colaboraram na definição do efeito do metaperiodato nas larvas de *S. venezuelensis*. A dosagem de carboidratos pelo método de fenol-ácido sulfúrico, resultante em zero para MP apoia, como abordagem complementar, os resultados dos testes histoquímicos.

A extensão da oxidação depende das condições utilizadas, e uma reação em condições suaves é utilizada para identificar anticorpos dirigidos contra epítomos que contenham terminais de açúcares não redutores e hexoses com ligação piranosídicas em cadeias de oligossacarídeos (WOODWARD; YOUNG JR; BLOODGOOD, 1985; KANNAGI;

HAKOMORI, 1986). Deve-se tomar cuidado com reações altamente rigorosas, já que oxidação prolongada e a concentração de metaperiodato podem destruir os aminoácidos dos polipeptídeos (LANGLEY et al., 1994). Da mesma forma, é possível que a oxidação dos grupos funcionais de carboidratos afete o reconhecimento de epítomos conformacionais (LANGLEY et al., 1994).

As condições de oxidação – em solução, concentração dos reagentes e passos de centrífugo-concentração – foram estabelecidas com base em protocolos publicados (ZHUAGN et al., 1993; MOHANTY et al., 2001; HERNÁNDEZ et al., 2008) e os controles necessários para evitar e monitorar os efeitos descritos foram aplicados. O tratamento do antígeno imobilizado em microplacas (LANGLEY et al., 1994; STERLA; SATO; NIETO, 1999; ALARCÓN DE NOYA et al., 2000; 2007; NEVES et al., 2003; KOUGUCHI et al., 2011), que minimizaria mudanças conformacionais (LANGLEY et al., 1994) foi realizado, mas os resultados foram insatisfatórios (dados não apresentados). Uma eventual destruição/degradação dos peptídeos foi descartada após controle com tampão acetato, dosagem de conteúdo proteico e, principalmente, análise do perfil eletroforético. A oxidação em pH ácido não teve efeito danoso nos epítomos proteicos, que preservaram a reatividade após o mesmo tempo de incubação somente com o tampão acetato, como em outros protocolos (YAMASHITA et al., 2002; ATTA et al., 2004). O perfil de MP 2, preparação oxidada e reduzida, não teve a resolução eletroforética das proteínas alterada em comparação ao extrato salino. Provavelmente, um ou a combinação dos fatores limitantes na reação com MP, descritos e discutidos acima, inviabilizou a aplicação no teste ELISA do extrato/fração de *Toxocara canis* tratados com MP e monitorados por SDS-PAGE (ROLDÁN GONZÁLES, 2014).

A reatividade cruzada dos anticorpos em várias situações, incluindo em imunoensaios, pode ser atribuída ao reconhecimento de determinantes de carboidratos (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000; FAIRLIE-CLARKE et al., 2010; NUNES et al., 2010; GONZAGA et al., 2011a; KIRINOKI et al., 2011). Metaperiodato de sódio é uma agente oxidante de carboidratos que pode eliminar parcialmente a reatividade cruzada, aumentando a especificidade dos testes imunológicos (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000). A simplicidade

dessa técnica torna-a preferível a outras de deglicosilação química (WOODWARD; YOUNG JR; BLOODGOOD, 1985). Além da aplicação na área de diagnóstico, a mensuração da reatividade de isotipos de anticorpos, após eliminação da fração de carboidratos dos antígenos, provou ser útil como medida de avaliação: do direcionamento de resposta imune durante estudos de coinfeção (FAIRLIE-CLARKE et al., 2010), de decaimento de IgG da fase aguda a crônica da doença de Chagas (UMEZAWA; YASUDA; STOLF, 1996), da avaliação da eficácia terapêutica – maior taxa de resultados negativos de pacientes tratados no ELISA-MP – na esquistossomose por *Schistosoma japonicum* (HUANG et al., 2003), e para avaliar o papel imunogênico dos carboidratos na filariose linfática bancroftiana (MOHANTY et al., 2001).

Tratamento com MP já foi empregado para aumentar a especificidade no diagnóstico de infecções fúngicas em humanos – histoplasmose (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 1994), aspergilose (YAMASHITA et al., 2002) e paracoccidioidomicose (NEVES et al., 2003) – e outras helmintíases – fasciolose (MAHER et al., 1999), esquistossomose (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000; KIRINOKI et al., 2011). A oxidação por MP em pH ácido diminuiu ou eliminou o reconhecimento de anticorpos do grupo positivo em imunoenaios que aplicaram: frações/proteínas definidas de *Paracoccidioides brasiliensis* (ELISA; NEVES et al., 2003), *Spirometra mansoni* (ELISA; CHUNG; KONG; YANG, 2004), *Echinococcus multilocularis* (ELISA; soros de cães; KOUGUCHI et al., 2011) e *Angiostrongylus cantonensis* (immunoblot; MORASSUTTI et al., 2012); e extrato total de *Leishmania chagasi* (ELISA; ATTA et al., 2004).

Esse princípio foi aplicado no diagnóstico da estrogiloidíase humana com o uso de antígeno homólogo de *S. stercoralis* (INÊS et al., 2013). No entanto a ação de MP na larva íntegra, a caracterização eletroforética dos preparados antigênicos, acima discutidos; e o reconhecimento da IgG e suas subclasses séricas anti-epítomos glicosilados de *S. venezuelensis* era desconhecida. Inês e colaboradores (2013) demonstraram que, no ELISA-MP com extrato de larvas filarioides de *S. stercoralis*, os epítomos glicosilados foram importantes para o reconhecimento de anticorpos IgG e IgE. Porém neste estudo os dados evidenciaram que a similaridade do padrão de reconhecimento envolvendo *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* não foi total em termos dos grupos funcionais de carboidratos. Por exemplo, a

sensibilidade e a especificidade não foram consideradas diferentes nos protocolos de ELISA descritos com antígenos homólogos (INÊS et al., 2013). Possivelmente, antígenos homólogos secundários impediram o reconhecimento, pela IgG de pacientes com *strongiloidíase*, dos glicoeptópos principais no protocolo de ELISA com extrato antigênico sem tratamento. Sudré e colaboradores (2007) atribuíram a eliminação dos resíduos de carboidratos pelo metaperiodato à alta reatividade e especificidade da banda polipeptídica de 26 kDa do antígeno larval de *S. stercoralis* testado após SDS-PAGE no *immunoblot*.

Os dados obtidos mostraram um decréscimo na reatividade de IgG anti-*Strongyloides* após a deglicosilação, em todos os grupos, mas que não influenciou a *performance* diagnóstica dos testes ELISA. Cabe assinalar que, para G3, o controle com tampão ácido (ES') também resultou em decréscimo da detecção IgG, mas com redução ainda na comparação entre ES' e MP. No presente estudo, o tratamento com metaperiodato do ES alterou os padrões de reconhecimento de IgG sérica humana *Strongyloides*-específica e de reatividade cruzada, resultados estes que divergem ou convergem com outros estudos. Atta e colaboradores (2004) observaram que o tratamento do antígeno de leishmania com MP não alterou as absorbâncias, no teste ELISA, no grupo negativo. Alarcón de Noya e colaboradores (2000) testaram amostras de soro de indivíduos negativos para esquistossomose em ELISA-MP, aumentando a especificidade. Por outro lado, o grupo de *S. mansoni* registrou 99% de amostras positivas nos dois protocolos de ELISA - com ou sem MP. Nos casos de coinfeção de malária e nematódeo, MP afetou tanto as respostas antígeno-específicas como as de reatividade cruzada (FAIRLIE-CLARKE et al., 2010).

No presente estudo, a IgG anti-*Strongyloides* foi detectada em 10% do G2 no protocolo ELISA-MP. Curiosamente, a maior diversidade de casos de outras parasitoses foi com MP (casos de coinfeção - *A. lumbricoides* + *T. trichiura* e ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura*; *S. mansoni*, *T. trichiura*, *H. nana* e cisticercose). Especula-se a manutenção de amostras de G2 positivas com conceitos aparentemente incompatíveis de complexidade (alteração da composição de epítópos proteicos e glicídicos e redução do reconhecimento) e redundância (variedade de reações cruzadas de IgG com epítópos, mesmo após tratamento) de epítópos entre os helmintos. Corrobora esse argumento os

resultados com antígeno homólogo de *S. stercoralis* – 22 % de amostras com outras parasitoses positivas em ELISA-MP (INÊS et al., 2013) e com fração sem epítomos glicosilados de manose não-ligante de concanavalina-A – 5 % de positividade no G2 (GONZAGA et al., 2011a); isto é houve manutenção de reatividade cruzada mesmo após perda/retirada de carboidratos, uma vez que alguns antígenos da reatividade cruzada são proteicos. Além disso, a complexidade de interação de epítomos de reatividade cruzada de mais de um parasito, como nos casos de coinfeção, pode ter levado uma amostra a um resultado positivo.

No entanto nenhuma amostra do G3 atingiu uma DO acima do *cut-off*. A maior especificidade verificada no ELISA-MP sugeriu que muitos epítomos glicosilados podem ser responsáveis pelas reações falso-positivas nos protocolos de ELISA convencionais. Diferenças no efeito do tratamento de MP nos valores de ELISA podem ser devidas às diferenças de composição dos epítomos alvo de cada amostra, que reflete no resultado do grupo, explicada pela diferença quali- e quantitativa no processo de exposição (KIRINOKI et al., 2011) e processamento de antígenos.

Mesmo com esse cenário distinto de anticorpos que reconhecem epítomos glicosilados ou periodato-resistentes, a *performance* diagnóstica do ELISA-MP apresentou os melhores índices diagnósticos. Além do aumento da especificidade, já discutido, outros índices obtidos podem ser destacados. Cálculos das LR combinam tanto sensibilidade como especificidade e, em geral, a maior LR+ e a menor LR– são mais satisfatórias na habilidade de discriminação de amostras, e ambas as condições foram obtidas no ELISA-MP. Com *intermediate range* (IR) menor, é possível selecionar um *cut-off*, sem obter Se e Es abaixo de uma significância estatística de 95%, com menor índice de resultados duvidosos e consequente maior proporção de resultados válidos (VRP); com MP a VRP atingiu 97,4%.

No resultado do perfil de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), na resposta contra antígenos com e sem presença de carboidratos detectáveis, os grupos testados tiveram uma redução da DO. Em G2 e G3, o tratamento revelou o mesmo efeito

nas subclasses, enquanto no G1 observou-se interação dos fatores. Nos grupos controle, a redução da média de IgG não pode ser atribuída a uma ou mais subclasses específicas.

Interessantemente, no G1, as quatro subclasses apresentaram diminuição no reconhecimento do extrato deglicosilado. Na estrogiloidíase humana, estudos anteriores estabeleceram variações no efeito imune efetor das subclasses de IgG. IgG1 está associada com um tempo de regulação dependente de infecção por *S. stercoralis*, é secretada em maior quantidade no início da infecção, e tende a diminuir com a cronicidade (ATKINS et al., 1997, 1999). Os níveis de IgG4 são mantidos por regulação positiva, como resultado da estimulação antigênica prolongada na fase crônica (ATKINS et al., 1997, 1999; SATOH et al., 2004). Os níveis de IgG2 e IgG3 específicas são baixos (CONWAY et al., 1994; ATKINS et al., 1997). Não há relato da pesquisa de subclasses relacionada ao reconhecimento de epítomos compostos tanto de resíduos de carboidratos, ou composto por esses grupos funcionais e os proteicos na estrogiloidíase humana.

Na hidatidose humana, o efeito diferencial do tratamento com periodato resultou na maior detecção de IgG2 anticarboidrato de baixa avidéz e IgG4 de alta avidéz contra peptídeos (STERLA; SATO; NIETO, 1999). Foi demonstrado, na esquistossomose, efeito semelhante: ligação reduzida de IgG2 nos preparados oxidados e reconhecimento por IgG4 de epítomos periodato-resistentes; enquanto IgG1 e IgG3 foram direcionados tanto a epítomos com carboidratos ou peptídicos (LANGLEY et al., 1994). A subclasse IgG3 *Fasciola*-específica pareceu direcionada contra epítomos com determinantes proteicos, IgG2 reconheceu epítomos de carboidratos e IgG1 e IgG4 ambos (MAHER et al., 1999). Classicamente, atribui-se a IgG2 a resposta quase exclusiva contra epítomos com resíduos de carboidratos que induzem, predominantemente, uma resposta linfócitos T-independente (SIBER et al., 1980; VON GUNTEN et al., 2009). No entanto, em *microarray* de glicanos a depleção de IgG2 de preparações de imunoglobulina endovenosa, mostrou um efeito mediano nos padrões de reconhecimento anticarboidrato (VON GUNTEN et al., 2009). Assim, mesmo que IgG2 represente de fato a maior parte da reatividade para muitos glicanos, talvez esse não seja o caso para *Strongyloides*, uma vez que, em IgG1 e IgG3, foi observada a maior redução de DO. Por exemplo, em pacientes infectados com *Plasmodium*

falciparum também foi detectado perfil diferencial das subclasses de IgG, sendo que IgG1 teve a maior proporção de decréscimo de reconhecimento de epítomos com carboidrato, seguida de IgG2, IgG3 e IgG4 (FERREIRA et al., 1996).

O controle com preparado exclusivamente de carboidratos, possivelmente, delinearía melhor o perfil de reconhecimento. A IgG2 de pacientes com filariose linfática bancroftiana reagiu no ELISA, principalmente com preparado de antígeno heterólogo rico em carboidratos, enquanto que os anticorpos IgG4 anti-filária teve níveis de detecção somente com antígeno oxidado com periodato. A reatividade de IgG3 foi maior para carboidratos, semelhante a IgG2, ao passo que IgG1 teve média maior para antígenos proteicos (MOHANTY et al., 2001).

Compatível com a ideia de reatividade cruzada está a utilização satisfatória de espécies de parasitos de um mesmo gênero para a produção de extratos heterólogos aplicados no imunodiagnóstico específico (PERALTA et al., 2010), ou seja, estabelece que a maior parte dos epítomos é compartilhada. Os carboidratos são, geralmente, entendidos como antígenos que desviam os epítomos que gerariam respostas imunoprotetoras nas helmintíases (MAIZELS et al., 1993). Portanto, a resposta antígeno-específica pode ser resultado de características mínimas da glicosilação proteica, como epítomos compostos tanto de proteínas como de grupos funcionais de carboidratos (HASLAM et al., 2003).

5.3

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LARVAS FILARIOIDES DE *Strongyloides venezuelensis* RECONHECIDAS POR IgG DE PACIENTES COM ESTRONGILOIDÍASE HUMANA POR TÉCNICAS PROTEÔMICAS

Considerando as limitações relacionadas ao imunodiagnóstico de *S. stercoralis*, principalmente, a reatividade cruzada com outras infecções parasitárias e testes positivos com soros de indivíduos saudáveis de área endêmica, esforços para atingir um diagnóstico confiável ainda são necessários. Avanços recentes em espectrometria de massas

e proteômica têm apresentado resultados promissores para o diagnóstico laboratorial de infecções parasitárias (VASOO; PRITT, 2013). Nematódeos, mesmo com tamanha diversidade, incluindo helmintos parasitos de humanos, têm, comparativamente, a outros grupos poucos estudos que empregaram técnicas proteômicas para estudar a Biologia destes (DOBOS et al., 2004). Além dos fatores que colocam tais doenças como negligenciadas (OLSEN et al., 2009), outra limitação para esses estudos é a falta de informação genômica disponível (SANCHEZ-FLORES, 2013). A combinação dos estudos imunológicos com a proteômica tem sido uma ferramenta importante para analisar respostas imunes, tanto no nível global dos organismos, quanto na caracterização de proteínas antigênicas individuais (HESS et al., 2005), e reconhecidas por anticorpos específicos (SOTILLO et al., 2008). Para identificar antígenos adequados para o imunodiagnóstico da strongiloidíase, o extrato salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* foi fracionado em resina de gel filtração (S-100), resolvido em SDS-PAGE 1D, testado em imunoensaio e submetido à espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática.

Os protocolos de fracionamento por exclusão molecular com preparados de *Strongyloides* já descritos utilizaram antígeno bruto de larvas L3 de *S. stercoralis*: extraído em água destilada e tratado com éter para remoção de lipídios aplicado em cromatografia com resina S-200 (MANGALI et al., 1991) ou extraídos em água e centrifugados em tubo com membrana filtrante - *cut-off* de 30 kDa (DEKUMYOY et al., 2002). Ambos não caracterizaram eletroforeticamente os antígenos. No primeiro estudo, com três frações consideradas, a primeira fração, teoricamente, somente com componentes de alto peso molecular, foi a mais reativa no ELISA-IgG com as amostras de todos os grupos testados. Mangali e colaboradores (1991) atribuíram a maior absorbância à maior quantidade de componentes antigênicos na fração inicial do que nas outras duas. Os antígenos abaixo de 30 kDa, no segundo estudo, foram menos reativos aos anticorpos IgG dos pacientes com outras infecções parasitárias e mantiveram o reconhecimento de anticorpos anti-*Strongyloides*, com especificidade de 78,44 %, comparada ao não fracionado (40,12 %). O número de casos falsos positivos para cada doença foi reduzido (DEKUMYOY et al., 2002).

No presente estudo, foi utilizada resina S-100 para o fracionamento de preparado heterólogo extraído em solução salina de L3 de *S. venezuelensis* (ES). Somente o cromatograma não foi suficiente para indicar os picos de fração, então, procedeu-se à análise eletroforética. Quando submetidas à SDS-PAGE, foi verificada evidente diferença do perfil do extrato salino total, reunidas em quatro frações (F1-F4), mas ainda com composição variável. Problemas na identificação das proteínas foram evitados ao buscar-se abordagem a partir de análise do gel 1D. Nos estudos que envolvem técnicas proteômicas entre as estratégias que são consideradas e aprimoradas para obtenção de dados, estão a preparação rápida de amostra para conseguir perfis proteicos reproduzíveis em SDS-PAGE (MORPHEW et al., 2007). Por exemplo, devido a um alto *background* e a baixa taxa de cobertura das sequências de *Spirometra erinaceieuropaei* não foi possível identificar os *spots* excisados de géis 2D (RAHMAN; LEE; BAE, 2011).

Para selecionar as bandas polipeptídicas a serem analisadas das frações F1-F4, estas foram testadas na detecção de IgG *Strongyloides*-específica por ELISA. A análise estatística avançada dos parâmetros de ELISA (GREINER, 1996; CROWTHER, 2009) apontou a F2 como a de melhor desempenho no diagnóstico baseado nos índices de IR, VRP, Es e LR+ e equivalência ao ES nos parâmetros de Se e LR-. Fez-se notar, também, a diminuição no IE no grupo de pacientes saudáveis (G3), exclusivamente, em F2 quando comparada ao ES. Demais comparações de IE das frações com o ES mostraram diminuição do índice no G1 (positivo) para todas as frações; e em relação ao G2 (outras parasitoses), o IE diminuiu, quando utilizadas F1 e F2 e aumentou em F3 e F4. Discutem-se estes resultados com os obtidos por Mangali e colaboradores (1991) que observaram maior valor de *cut-off* para a fração com proteínas de maior massa molecular, de forma semelhante ao resultado de F1; e os de Dekumyoy e colaboradores (2002) que, mesmo com protocolo com moderada especificidade (< 80 %), conseguiram aumentá-la com fração de proteínas < 30 kDa, que seria comparável à F3 e, principalmente F4, mas que apresentaram valores menores de *cut-off*, Se e Es. Justificam-se esses achados mistos com a presença de epítomos determinantes de reatividade diferencial em cada fração obtida, reiterando a necessidade de identificação e definição de alvos diagnósticos específicos e sensíveis.

No entanto, deve-se considerar que um alto nível de purificação de antígenos parasitários pode ser relacionado a um aumento de especificidade acompanhado de redução nos índices de sensibilidade (CHENTHAMARAKSHAN; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001).

A cromatografia de gel filtração simples não foi suficiente para separar uma banda polipeptídica definida e esses antígenos específicos poderiam ter sido detectados por *immunoblot*. As bandas submetidas à análise de espectrometria de massas derivaram dos resultados de ELISA-IgG, no entanto as regiões imunodominantes de antígenos homólogos e heterólogos reconhecidas por pacientes infectados com *S. stercoralis* em *immunoblot*, documentadas na literatura, compreendem várias massas moleculares – de 17 kDa (GENTA et al., 1988) a 138 kDa (SILVA et al., 2002). Dados produzidos por perfis de *immunoblot* 1D estão disponíveis (GENTA; LILLIBRIDGE, 1989; SATO et al., 1990; CONWAY et al., 1993, 1994; LINDO et al., 1994; SIDDIQUI et al., 1997; UPARANUKRAW; PHONGRSI; MORAKOTE, 1999; ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004; SUDRÉ et al., 2007; MACHADO et al., 2008b; RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010). Assim, experimentos de purificação adicionais foram evitados. As tecnologias de alto rendimento (*high-throughput*) disponíveis para avaliação de proteoma e a não necessidade da busca em proteínas selecionadas propiciaram: a avaliação de antígenos em conjuntos maiores de proteínas nativas, a diminuição da dependência das tecnologias recombinantes para expandir o *pool* de proteínas triadas (DOBOS et al., 2004) e menos exigências para as amostras (DA SILVA et al., 2012).

Como F2 demonstrou ser fonte importante de componentes antigênicos para detectar IgG, cinco bandas que cobriram a maior amplitude (60, 45, 33, 30 e 13 kDa) foram excisadas e encaminhadas para espectrometria de massas. Até a elaboração da tese, somente as de 60 e 33 kDa foram processadas. Para as duas bandas, de acordo com os critérios de análise dos dados de *score*, taxa de cobertura e peptídeos únicos, considerou-se a identificação de três proteínas: *aspartic protease 4*, 14-3-3 zeta e HSP 60. Todas, a partir do banco de dados (UniProt; NCBI) de *S. ratti*, com alto grau de homologia.

Aspartato proteases (ASP) são definidas pela presença de resíduos de ácido aspártico catalíticos no seu sítio ativo e incluem pepsinas, reninas e catepsinas. Nos nematódeos, as aspartato proteases têm papel no parasitismo: degradam macromoléculas da pele e ajudam na digestão de hemoglobina – em ancilostomatídeos ou muco – *Strongyloides ratti* (EVANS et al., 2008). Como antígeno, as aspartato proteases têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas contra ancilostomatídeos (LOUKAS et al., 2006). Especificamente, ASP-4 de *S. ratti* não possui um sítio de N-glicosilação, necessário para o *targeting* lisossomal (MELLO et al., 2009). Os transcritos em *S. ratti* foram menores nos estádios larvais imaturos, comparados a L3 infectante ou nas formas adultas (MELLO et al., 2009). A identificação em *S. venezuelensis* de uma ASP-4 homóloga e a descrição de papel imunogênico tornam-na de interesse no diagnóstico, como síntese futura de peptídeo.

As proteínas 14-3-3 representam uma família amplamente expressa nos eucariotos. Apresentam, aproximadamente, 30 kDa e formam dímeros espontâneos de ligação fosfoserina-treonina (SILES-LUCAS; GOTTSTEIN, 2003). Estão envolvidas no ciclo e regulação celular (sinalização, interação proteína-proteína e ativação ou inibição de enzimas). Em helmintos, caracterizações das 14-3-3 foram feitas, principalmente, em *Schistosoma* spp. e *Echinococcus* spp. Na expressão estágio-específica, o papel na proliferação e sobrevivência dos parasitos e a função isoforma específica apontaram as 14-3-3 como candidatas vacinais (SILES-LUCAS; GOTTSTEIN, 2003). As proteínas da subfamília da isoforma zeta foram aplicadas nos ensaios de vacinação e conferiram significativa proteção na esquistossomose e hidatidose (SILES-LUCAS; GOTTSTEIN, 2003). Na espécie humana, algumas 14-3-3 são relacionadas à carcinogênese. A 14-3-3 zeta foi aplicada em teste ELISA como biomarcador de pacientes com câncer epitelial ovariano, mas sem diferenciação dos grupos (HATZIPETROS et al., 2013). Com base nesses dados, a busca pelo papel da 14-3-3 zeta no diagnóstico da estrogiloidíase é sugerida, especialmente, com regiões de peptídeos diferentes de nematódeos e do humano.

A proteína HSP60 pertence à família de chaperonas e é constituída pela associação de subunidades proteicas de 30 kDa. Originalmente, identificadas com base na expressão aumentada em células submetidas a choque-térmico ou outro estresse, mas, atualmente, há evidências que atuam em outros processos celulares como sinalização e imunidade (CALDERWOOD; MAMBULA; GRAY JR.; 2007). Entre as proteínas de excreção/secreção de *S. ratti*, HSP60 é um dos componentes principais e tem função de alvo da resposta imune celular e humoral na infecção de camundongos (TAZIR et al., 2009; BEN NOUIR et al., 2012). Já aplicada em estudo de imunização, HSP60 recombinante – combinada a diferentes adjuvantes – ou seu anticorpo monoclonal (IgM) conferiram proteção a modelos murinos (BEN NOUIR et al., 2012). Por induzir resposta mediada por anticorpos contra a infecção por *S. ratti* tipicamente de perfil Th1, sugere-se que, no imunodiagnóstico, poderia ser útil como marcador de fase de infecção pelo perfil de detecção de isotipos (ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007) ou pela avaliação da avidéz (GONZAGA et al., 2011b).

Variações nos protocolos de sorodiagnóstico da strongiloidíase são avaliadas pelos laboratórios de pesquisa, no entanto a identificação e caracterização para o diagnóstico de peptídeos/proteínas não são frequentes. Os antígenos recombinantes descritos e aplicados em imunoensaios foram: 5a, 12a (RAMACHANDRAN et al., 1998) e NIE (*recombinant immunodiagnostic antigen*; antígeno imunodiagnóstico recombinante) (RAVI et al., 2002); e, recentemente, peptídeos recombinantes ligados a fagos e, posteriormente, sintetizados (FELICIANO, 2014). Mesmo que imunogênicos, outros exemplos de antígenos recombinantes já descritos não foram testados para diagnóstico. Por exemplo, foram avaliados os antígenos Ss-TMY-1, Ss-EAT-6, Ss-LEC-5 e Ss-IR pelo grau de reconhecimento de IgG humana de pacientes com strongiloidíase, mas somente com Ss-IR obteve-se resultados de eficácia como parte de uma vacina (ABRAHAM et al., 2011). No entanto, NIE é caracterizado como bom candidato a plataformas LIPS-IgG e ELISA-IgG (RAMANATHAN et al., 2008; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013), mas não foi capaz de induzir resposta imune

protetora em projetos com vacinas (ABRAHAM et al., 2011). O ELISA para detecção de anticorpos contra *strongylastacin* recombinante, uma metaloprotease dependente de zinco componente do antígeno de excreção/secreção, não teve especificidade satisfatória na detecção de IgG normais, porém foi altamente sensível e específica para IgE (VARATHARAJALU et al., 2011). Poucas são as sequências de aminoácidos ou proteínas específicas avaliadas como marcadores de imunodiagnóstico da estrongiloidíase, assim, novas ferramentas são necessárias para a avaliação do diagnóstico diferencial de infecções ativas, de exposições passadas e para o monitoramento da efetividade do tratamento.

Neste estudo, aplicando essa combinação de técnicas, foi possível: (1) estabelecer uma fração representativa de polipeptídeos mais bem reconhecida pelo soro de pacientes infectados com estrongiloidíase, (2) identificar proteínas de *Strongyloides* reconhecidas por IgG gênero-específica e (3) discutir possíveis epítomos para posterior utilização em imunoensaios diagnósticos ou vacinais, fornecendo alternativas moleculares para as populações com estrongiloidíase. Estudos proteômicos podem ser utilizados como método de triagem para formular hipóteses e guiar pesquisas futuras (MILARDI et al., 2013). Pesquisas adicionais incluindo alternativas para detecção por *immunoblot*, refinamento das análises *in silico*, síntese química dos peptídeos alvo e aplicação em testes imunoenzimáticos são necessárias para a caracterização definitiva dos epítomos reconhecidos por anticorpos no diagnóstico da estrongiloidíase.

6. CONCLUSÃO

A fração DEAE S2 que interagiu com a resina dietilaminoetil-Sephrose demonstrou ser fonte de peptídeos sensíveis e específicos para detecção de IgG no sorodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

O tratamento com metaperiodato de sódio nos protocolos padronizados foi adequado tanto para larvas íntegras de *S. venezuelensis* quanto do extrato salino. A deglicosilação química do antígeno larval heterólogo diminuiu a média de IgG nos pacientes com estrogiloidíase e também a reatividade cruzada/os resultados falsos positivos nos grupos controle, demonstrando o papel dos resíduos de carboidratos no reconhecimento da IgG e suas subclasses anti-*Strongyloides*.

A fração F2, obtida após gel filtração, é composta por proteínas imunodominantes, entre elas as já identificadas ASP-4, 14-3-3 zeta e HSP60. Esses dados, em conjunto com análises imunológicas complementares e *in silico* detalhadas – como predição de epítomos de células B das proteínas de F2 em conjunto com a avaliação de peptídeos com carga final negativa, com e sem sítios de glicosilação – permitirão a definição de peptídeos para utilização em ensaios vacinais ou de diagnóstico da estrogiloidíase humana.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2010. 566 p.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.
- ABRAHAM, D.; HESS, J. A.; MEJIA, R.; NOLAN, T. J.; LOK, J. B.; LUSTIGMAN, S.; NUTMAN, T. B. Immunization with the recombinant antigen Ss-IR induces protective immunity to infection with *Strongyloides stercoralis* in mice. **Vaccine**, v. 29, p. 8134-8140, 2011.
- 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.
- AHMADI, N. A.; DAMRAJ, F. A. A field evaluation of formalin-gasoline technique in the concentration of stool for detection of intestinal parasites. **Parasitology Research**, v. 104, p. 553-557, 2009.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; COLMENARES, C.; LANZ, H.; CARACCIOLO, M. A.; LOSADA, S.; NOYA, O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 106-112, 2000.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; RUIZ, R.; LOSADA, S.; COLMENARES, C.; CONTRERAS, R.; CESARI, I. M.; NOYA, O. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria: the Venezuelan experience. **Acta Tropica**, v. 103, p. 41-49, 2007.
- AMLABU, E.; NOK, A. J.; SALLAU, A. B. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. **Parasitology International**, v. 58, p. 238-243, 2009.
- ANAMNART, W.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. A modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of human strongyloidiasis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 51, p. 743-745, 2013.
- ANDERSON, N. W.; KLEIN, D. M.; DORNINK, S.; JESPERSEN, D. J.; KUBOFCKI, J.; NUTMAN, T. B.; MERRIGAN, S. D.; COUTURIER, M. R.; THEEL, E. S. Comparison of three immunoassays for the detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, p. 732-736, 2014.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford: C.A.B International, 2000. 650 p.

¹ Segundo normas adaptadas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descritas em FUCHS, A. M. S.; FRANÇA, M. N.; PINHEIRO, M. S. F. **Guia para normalização de trabalhos técnico-científicos**. Uberlândia: EDUFU, 2013. 286 p.

ANDRADE-NETO, J. L.; ASSEF, M. C. V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 1373-1378, 1996.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER-JR., M. J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 975-987, 2007.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 517-526, 1999.

ATKINS, N. S.; LINDO, F. J.; CONWAY, D. J. BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D., BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997.

ATTA, A. M.; COLOSSI, R.; SOUSA-ATTA, M. L.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, M. D.; BEZERRA, G. F.; ORGE, G.; CARVALHO, E. M. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 525-530, 2004.

BAEK, B.; WHANG, I.; ISLAM, M. K.; KIM, B.; KAKOMA, I. Persistent infection with *Strongyloides venezuelensis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **The Korean Journal of Parasitology**, v. 40, p. 181-186, 2002.

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

BARROS, N.; MONTES, M. Infection and hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*: clinical presentation, etiology of disease, and treatment options. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 223-228, 2014.

BEN NOUIR, N.; 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.

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. Carbohydrates can be attached to proteins to form glycoproteins. In: _____. **Biochemistry**. 5 ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2002. p. 306-317.

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. P. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, p. 1521-1532, 2006.

BIGGS, B.; CARUANA, S.; MIHRSHAHI, S.; JOLLEY, D.; LEYDON, J.; CHEA, L.; NUON, S. Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 788-791, 2009.

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

BLANKENHAUS, B.; KLEMM, U.; ESCHBACH, M.; SPARWASSER, T.; HUEHN, J.; KUHL, A. A.; LODDENKEMPER, C.; JACOBS, T.; BRELOER, M. *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3 + regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. **The Journal of Immunology**, v. 186, p. 4295-4305, 2011.

BLANKENHAUS, B.; REITZ, M.; BRENZ, Y.; ESCHBACH, M. L.; HARTMANN, W.; HABEN, I.; SPARWASSER, T.; HUEHN, J.; KÜHL, A.; FEYERABEND, T. B.; RODEWALD, H. R.; BRELOER, M. Foxp3⁺ regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. **PLoS Pathogens**, v. 10, e1003913, 2014.

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

BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic Research**, v. 51, p. 205-214, 2011.

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L.; SEET, R. C.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **American Journal of Medicine**, v. 120, p. 545-548, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de Microbiologia**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 290 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448 p.

CALDERWOOD, S. K.; MAMBULAS, S. S.; GRAY JR., P. J. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 163, p. 4971-4976, 2007.

CAMARGO, R. E.; UZCANGA, G. L.; BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 67-81, 2004.

CAMPOS, D. M. B.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (DARLING, 1911) no diagnóstico da strongiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 17, p. 17-23, 1988.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. U.S. Department of Health and Human Services, **CDC Health Information for International Travel**. Oxford University Press, 2012. 640 p.

_____. _____. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. **Strongyloidiasis**. 2013. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in

patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and reviews of the literature. **Medicine**, v.73, p. 256-263, 1994.

CHENTHAMARAKSHAN, V.; VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S. D. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 39, p. 1-7, 2001.

CHENTHAMARAKSHAN, V.; REDDY, M. V.; HARINATH, B. C. Diagnostic potential of fractionated *Brugia malayi* microfilarial excretory/secretory antigen for bancroftian filariasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 252-254, 1996.

CHIUSO-MINICUCCI, F.; MARRA, N. M.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, M. R. V.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A. Recovery from *Strongyloides venezuelensis* infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response. **Parasite Immunology**, v. 32, p. 74-78, 2010.

CHOI, H. W.; ABRAHAM, S. N. Mast cell mediator responses and their suppression by pathogenic and commensal microorganisms. **Molecular Immunology**, v. 63, p. 74-79, 2015.

CHUNG, Y. B.; KONG, Y.; YANG, H. J. Enzymatic N-glycan analysis of 31 kDa molecule in plerocercoid of *Spirometra mansoni* (sparganum) and its antigenicity after chemical oxidation. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 42, p. 57-60, 2004.

CIMINO, R. O.; KROLEWIECKI, A. The epidemiology of human strongyloidiasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 216-222, 2014.

COBB, N. A. Rhabditin: Contribution to a science of Nematology. **The Journal of Parasitology**, v. 1, p. 40-41, 1914.

CONWAY D. J.; ATKINS, N. S.; LILLYWHITE, J. E.; BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; LINDO, J. F.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. Immuno-diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect-ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 173-176, 1993a.

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

CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A.E. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 99-105, 1994.

CORRAL, M. A.; PAULA, F. M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D. M.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKE, R. C. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 77-80, 2015.

COSTA, I. N.; SOPELETE, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306-311, 2003.

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

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

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

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

CROWTHER, J. W. More advanced statistical methods for quality assurance, test validation, and interpretation. In: _____. **The ELISA guidebook**. 2 ed., New York: Humana Press, 2009. p. 467-516.

DA SILVA, N.; DÍEZ, P.; MATARRAZ, S.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.; PARADINAS, S.; ORFAO, A.; FUENTES, M. Biomarker discovery by novel sensors based on nanoproteomics approaches. **Sensors**, v. 12, p. 2284-2308, 2012.

DE GRAAF, D. C.; BERGHEN, P.; HILDERSON, H.; DE COCK, H.; VERCRUYSSSE, J. Identification and purification of *Cooperia oncophora*-specific antigens to improve serological diagnosis. **International Journal for Parasitology**, v. 23, p. 141-144, 1993.

DEKUMYOY, P.; SOMTANA, K.; JANTANAWIWAT, P.; NUAMTANONG, S.; SA-NGUANKIAT, S.; NUCHFAONG, S.; JANYAPOON, K.; CHINDANOND, D. Improved antigens for IgG-ELISA diagnosis of strongyloidiasis. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 33, p. 53-59, 2002.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE D. (Editor). **The biology of nematodes**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 1-30.

DEVI, U.; BORKAKOTY, B.; MAHANTA, J. Strongyloidiasis in Assam, India: a community-based study. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 30-32, 2011.

DIONISIO, D.; MANNESCHI, LI.; DI LOLLO, S.; ORSI, A.; TANI, A.; PAPUCCI, A.; ESPERTI, F.; LEONCINI, F. *Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 110-116, 2000.

DOBOS, K. M.; SPENCER, J. S.; ORME, I. M.; BELISLE, J. T. Proteomic approaches to antigen discovery. **Molecular Diagnosis of Infectious Diseases: Methods in Molecular Medicine**, v. 94, p. 3-17, 2004

DONG, W. H.; WANG, T. Y.; WANG, F.; ZHANG, J. H. Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue. **PLoS One**, v. 6, e22394, 2011.

EL-BADRY, A. A. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39, p. 757-768, 2009.

ELLIOTT, D. E.; SUMMERS, R.W.; WEINSTOCK, J. V. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 457-464, 2007.

EVANS, H.; MELLO, L. V.; FANG, Y.; WIT, E.; THOMPSON, F. J.; VINEY, M. E.; PATERSON, S. Microarray analysis of gender- and parasite-specific gene transcription in *Strongyloides ratti*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1329-1341, 2008.

EYLAR, E. H.; JAENLOZ, R. W. Periodate oxidation of the α 1 acid glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 1021-1025, 1962.

FAIRLIE-CLARKE, K. J.; LAMB, T. J.; LANGHORNE, J.; GRAHAM, A. L.; ALLEN, J. E. Antibody isotype analysis of malaria-nematode co-infection: problems and solutions associated with cross-reactivity. **BMC Immunology**, v. 11, doi: 10.1186/1471-2172-11-6, 2010.

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J.; 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. **Seleção e aplicação de peptídeos recombinantes e sintéticos obtidos por Phage display no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana**. 2014. -. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

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.; FUJIMURA, P. T.; GONZAGA, H. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2792, 2014.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T. M.; ESCHENAZI, P. D.; SCHILTER, H. C.; SOUSA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 139-149, 2008.

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

FERREIRA, M. S. Infecções no hospedeiro imunocomprometido. In: COURA, J. R. (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FERREIRA, M. U.; KIMURA, E. A.; SOUZA, J. M.; KATZIN, A. M. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 315-323, 1996.

- FINLAY, C. M.; WALSH, K. P.; MILLS, K. H. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. **Immunological Reviews**, v. 259, p. 206-230, 2014.
- FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982.
- GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 157-161, 1987.
- GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 345-355, 1992.
- GENTA, R. M. The immune regulation of intestinal helminthiasis. In: PARADISE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Enteric Infections and Immunity**. Nova York: Springer, 1996. p. 239-252.
- GENTA, R. M.; FREI, D. F.; LINKE, M. J. Demonstration and partial characterization of parasite-specific immunoglobulin A responses in human strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1505-1510, 1987.
- GENTA, R.M.; LILLIBRIDGE, J. P. Prominence of IgG4 antibodies in the human responses to *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 160, p. 692-699, 1989.
- GEORGE, P. J.; KUMAR, N. P.; SRIDHAR, R.; HANNA, L. E.; NAIR, D.; BANUREKHA, V. V.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Coincident helminth infection modulates systemic inflammation and immune activation in active pulmonary tuberculosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e3289, 2014.
- GOMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. Identification and partial purification of a 26 kilodalton antigen of adult *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 311-318, 1996.
- GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, F.; CARDOSO, C.; BELETTI, M.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 319-328, 2009.
- GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 125 p. 338-341, 2010.
- GONÇALVES, A. L.; ROCHA, C. A.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 79-84, 2012.
- GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70, p. 78-84, 2011a.

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; MANHANI, M. N.; SILVA, D. A.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. **Immunology Letters**, v. 139, p. 87-92, 2011b.

GRANHOLM, V.; KÄLL, L. Quality assessments of peptide-spectrum matches in shotgun proteomics. **Proteomics**, v. 11, p. 1086-1093, 2011.

GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, p. 145-146, 1995.

GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimize overall misclassification costs. **Journal of Immunological Methods**, v. 191, p. 93-94, 1996.

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.

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

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

GROVE, D. I.; NORTHERN, C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 833-838, 1982.

HANLEY, J. A.; McNEIL, B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. **Radiology**, v. 148, p. 839-843, 1983.

HANLEY, J. A.; McNEIL, B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, v. 143, p. 29-36, 1982.

HARADA, T.; MORI, O. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-179, 1955.

HASLAM, S. M.; RESTREPO, B. I.; OBREGÓN-HENAO, A.; TEALE, J. M.; MORRIS, H. R.; DELL, A. Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 103-107, 2003.

HATZIPETROS, I.; GOCZE, P.; KOSZEGI, T.; JARAY, A.; SZEREDAY, L.; POLGAR, B.; FARKAS, N.; FARKAS, B. Investigating the clinical potential for 14-3-3 zeta protein to serve as a biomarker for epithelial ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, 2013.

HERBERT, D. R.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 95-101, 2002.

HERNÁNDEZ, H.; MARCET, R.; FIGUEREDO, M.; GARRIDO, N.; SARRACENT, J. Comparative study of

epitopes recognized by two monoclonal antibodies that protects mice against *Trichomonas vaginalis* challenge. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 583-586, 2008.

HESS, J. L.; BLAZER, L.; ROMER, T.; FABER, L.; BULLER, R. M.; BOYLE, M. D. P. Immunoproteomics. **Journal of Chromatography B**, v. 815, p. 65-75, 2005.

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.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 6, p. 65-70, 1979.

HONG, Y.; KIM, J.; RHEEM, I.; KIM, J.; KIM, S.; CHAI, J.; GUK, S.; LEE, S.; SEO, M. Observation of the free-living adults of *Strongyloides stercoralis* from a human stool in Korea. **Infection and Chemotherapy**, v. 41, p. 105-108, 2009.

HUAMAN, M. C.; SATO, Y.; AGUILAR, J. L.; TERASHIMA, A.; GUERRA, H.; GOTUZZO, E.; KANBARA H. Gelatin particle indirect agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis using *Strongyloides venezuelensis* antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 535-538, 2003.

HUANG, Y. L.; YI, X. Y.; ZENG, X. F.; ZHANG, R.; YUAN, S. S. Study on diagnosis of schistosomiasis by ELISA using periodat-treated soluble egg antigen. **Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases**, v. 21, p. 238-241, 2003. Resumo.

INÊS, E. J.; SILVA, M. L.; SOUZA, J. N.; TEIXEIRA, M. C.; SOARES, N. M. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 31-35, 2013.

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

JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; SACKET, D. L. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 703-707, 1994.

KAKATI, B.; DANG, S.; HEIF, M.; CARADINE, K.; McKNIGHT, W.; ADULI, F. *Strongyloides* duodenitis: case report and review of literature. **Journal of the National Medical Association**, v. 103, p. 60-63, 2011.

KANNAGI, R.; HAKOMORI, S. Monoclonal antibodies directed to carbohydrate antigens. In: WEIR, D. M. (Editor). **Handbook of Experimental Immunology**. 4. Ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.

KAUSHAL, N. A.; SRIVASTAVA, N.; MUSTAFA, H.; TANDON, A.; SINGH, S. K.; KAUSHAL, D. C. Isolation of an antigen fraction from *Setaria cervi* adults having potential for immunodiagnosis of human filariasis. **Immunological Investigations**, v. 38, p. 749-761, 2009.

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

KEREPESI L. A.; HESS, J. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 28-34, 2007.

KILEJIAN, A.; SAUER, K.; SCHWABE, C. W. Host-parasite relationships in echinococcosis. VIII. Infrared spectra and chemical composition of the hydatid cyst. **Experimental Parasitology**, v. 12, p. 377-292, 1962.

KIRINOKI, M.; CHIGUSA, Y.; OHMAE, H.; SINUON, M.; SOCHEAT, D.; MATSUMOTO, J.; KITIKOON, V.; MATSUDA, H. Efficacy of sodium metaperiodate (SMP)-ELISA for the serodiagnosis of schistosomiasis mekongi. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, p. 25-33, 2011.

KNOPP, S.; SALIM, N.; SCHINDLER, T.; KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; ROTHEN, J.; LWENO, O.; MOHAMMED, A. S.; SINGO, R.; BENNINGHOFF, M.; NSOJO, A. A.; GENTON, B.; 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. 535-45, 2014.

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IELDA, M.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991.

KOUGUCHI, H.; MATSUMOTO, J.; YAMANO, K.; KATOH, Y.; OKU, Y.; SUZUKI, T.; YAGI, K. *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization of glycoprotein antigens with serodiagnostic potential for canine infection. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 50-56, 2011.

KOZUBSKY, L.; ARCHELLI, S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 38, p. 333-338. 2004.

KRAMME, S.; NISSEN, N.; SOBLIK, H.; ERTTMANN, K.; TANNICH, E.; FLEISCHER, B.; PANNING, M.; BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 454-458, 2010.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédica: Editora da Universidade Rural (EDUR), 1997. 198 p.

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

LANGLEY, J.G.; KARIUKI, H. C.; HAMMERSLEY, A. P.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E.; DUNNE, D. W. Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* egg antigens. **Immunology**, v. 83, p. 651-658, 1994.

LAWRENCE, A. M.; BESIR, H. U. Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. **Journal of Visualized Experiments**, doi: 10.3791/1350, 2009.

LEE, O. R.; CHUNG, P. R. Immunoelectron microscopic localization of partially purified antigens in adult *Paragonimus iloktsuenesis*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, p. 119-132, 2001.

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

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis: Burgess, 1979. 427p.

LINDO, J. F.; ATKINS, N. S.; LEE, M. G.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Parasite specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 702-703, 1996.

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

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

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

LOCQUIN, M.; LANGERON, M. **Handbook of Microscopy**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1983. 312 p.

LOK, J. B. *Strongyloides stercoralis* and relatives: Recent advances in General and Molecular Biology. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 194-206, 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. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose 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. 39, p. 161-164, 1998.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003.

- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005.
- MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONCALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO, Z. M.; ARAUJO, 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.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7-14, 2008b.
- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SILVA, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COSTA-CRUZ, J. M.; FACCIOLI, L. H. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 72-79, 2011.
- MAHER, K.; EL RIDI, R.; EL HODA, A. N.; EL-GHANNAM, M.; SHAHEEN, H.; SHAKER, Z.; HASSANEIN, H. I. Parasite-specific antibody profile in human fascioliasis: application for immunodiagnosis of infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 738-742, 1999.
- MAIZELS, R. M.; BUNDY, D. A. P.; SELKIRK, M. E.; SMITH, D. F.; ANDERSON, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797-805, 1993.
- MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 733-744, 2003.
- MANGALI, A.; CHAICUMPA, W.; NONTASUT, P.; CHANTAVANIJ, P.; TAPCHASRI, P.; VIRAVAN, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human strongyloidiasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 22, p. 88-92, 1991.
- 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.
- MARCILLA, A.; SOTILLO, J.; PÉREZ-GARCIA, A.; IGUAL-ADELL, R.; VALERO, M. L.; SÁNCHEZ-PINO, M. M.; BERNAL, D.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; TRELIS, M.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. **Parasitology**, v. 14, p. 1-7, 2010.
- MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 314-318, 2008.
- MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; FRANÇA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; AMARANTE, A. F.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57-61, 2010.

MARTINEZ, A. M. B.; SOUZA, W. A quick-frozen, freeze-fracture, and deep-etch study of the cuticle of adult forms of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). **Parasitology**, v. 111, p. 523-529, 1995.

MARTINEZ, A. M. B.; SOUZA, W. A freeze-fracture and deep-etch study of the cuticle and hypodermis of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). **International Journal of Parasitology**, v. 23, p. 289-297, 1997.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 11, p. 7-31, 2003.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ-CAABEIRO, F. Purification of *Trichinella spiralis* tubulin: comparison of several analytic procedures. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 115-121, 1998.

MARUYAMA, H.; EL-MALKY, M.; KUMAGI, T.; OHTA, N. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. **Parasitology**, v. 126, p. 165-171, 2003.

MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; EL-MALKY, M.; OKAMURA, S.; AOKI, M.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; SHIMADA, S.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 179-185, 2002.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 10-15, 1997.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 16-20, 1998.

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.

MATSUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72, 2005.

McGONIGLE, S.; DALTON, J. P. Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. **Parasitology**, v. 111, p. 209-215, 1995.

MELLO, L. V.; O'MEARA, H.; RIGDEN, D. J.; PATERSON, S. Identification of novel aspartic proteases from *Strongyloides ratti* and characterisation of their evolutionary relationships, stage-specific expression and molecular structure. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA JÚNIOR, 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.

MESSIAS, I. J. T.; GENTA, R. M.; MOHREN, W. D. Adherence of monocytes and polymorphonuclear

cells to infective larvae of *Strongyloides stercoralis* after complement activation. **Journal of Parasitology**, v. 80, p. 267-274, 1994.

MILARDI, D.; GRANDE, G.; VINCENZONI, F.; CASTAGNOLA, M.; MARANA, R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 350-357, 2013.

MOHANTY, M. C.; SATAPATHY, A. K.; SAHOO, P. K.; RAVINDRAN, B. Human bancroftian filariasis – a role for antibodies to parasite carbohydrates. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 124, p. 54-61, 2001.

MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONCK, K.; LAKE, J. E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D. E.; GOTUZZO, E.; WHITE JUNIOR, A. C. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, e456, 2009.

MONTES, M.; SAWHNEY, C.; BARROS N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, p. 500-504, 2010.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 64, p. 507-624, 1948.

MORPHEW, R. M.; WRIGHT, H. A.; LA COURSE, E. J.; WOODS, D. J.; BROPHY, P. M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture *ex host*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, p. 963-972, 2007.

MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; FERREIRA JÚNIOR, 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.

MORASSUTTI, A. L.; LEVERT, K.; PERELGIN, A.; SILVA, A. J.; WILKINS, P.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, p. 961-968, 2012.

NAGAYASU, E.; OGURA, Y.; ITOH, T.; YOSHIDA, A.; CHAKRABORTY, G.; HAYASHI, T.; MARUYAMA, H. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology International**, v. 62, p. 57-65, 2013.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G. ; PEREIRA, A. T. de M.; FERNANDES, A.; SCHEURMANN, K.; HAMER, F.; SOUZA, A. L.; MARTINS, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M. M. The mutual influence of Nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 90, p.14-28, 2006.

NEVES, A. R.; MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity

immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 802-807, 2003.

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

NORTHERN, C.; GROVE, D. I. Antigenic analysis of *Strongyloides ratti* infective larvae and adult worms. **Immunology & Cell Biology**, v. 65, p. 231-239, 1987.

NORTHERN, C.; GROVE, D. I.; WARTON, A.; LOVEGROVE, F. T. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 75, p. 487-92, 1989.

NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; COSTA-CRUZ, J. M. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 259-264, 2010.

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.; MAGNUSSEN, 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.

ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 209-236, 2000.

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 802-807, 1991.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. A. The enigmatic eosinophil: Investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 93-104, 1997.

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

PAULA, F. M.; CASTRO-BORGES, W.; PEREIRA-JÚNIOR, O. S.; GOMES, M. S.; UETA, M. T.; RODRIGUES, V. The ubiquitin-proteasome system in Strongyloidea. Biochemical evidence for developmentally regulated proteolysis in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 567-576, 2009.

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

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSHECK, R. C.; CHIEFFI, P.

P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 141-143, 2013.

PERALTA, R. H.; ESPÍNDOLA, N. M.; PARDINI, A. X.; IHA, A. H.; MOURA, H.; BARR, J. R.; VAZ, A. J.; PERALTA, J. M. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 295-300, 2010.

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.

POLANCO, L. C; GUTIÉRREZ, L. A.; ARIAS, I. J. Infección por *Strongyloides stercoralis*: Metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). **Revista Española de Salud Pública**, v. 88, p. 581-600, 2014.

PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, X. Strongyloidiasis - an insight into its global prevalence and management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e3018, 2014.

RAHMAN, M.; LEE, E.; BAE, Y. Two-dimensional immunoblot analysis of antigenic proteins of *Spirometra* plerocercoid recognized by human patient sera. **Parasitology International**, v. 60, p. 139-143, 2011.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 196-203, 1998.

RAMANATHAN R, BURBELO PD, GROOT S, IADAROLA MJ, NEVA FA, NUTMAN, T. B. A Luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 444-451, 2008.

RAPOPORT, A. B.; McCORMICK, D.; COHEN, P. A. Screening for *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides stercoralis* infection among Brazilian immigrants in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, doi: 10.1093/ofid/ofv003, 2015.

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 73-81, 2002.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; CHIODINI, P.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; GOTUZZO, E.; MUÑOZ, J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2002, 2013.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; BUONFRATE, D.; BISOFFI, Z.; MUÑOZ GUTIÉRREZ, J. Advances in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 207-215, 2014.

REVILLA-NUÍM, B.; MANGA-GONZÁLES, M. Y.; MIÑAMBRES, B.; GONZÁLEZ-LANZA, C. Partial characterization and isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 229-240, 2005.

REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidíase. In: _____. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 581-590.

RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 107, p. 221–225, 2010.

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

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

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 89-93, 2004.

RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v. 128, p. e432-e441, 2009.

ROLDÁN GONZÁLES, W. H. **Deglicosilação de antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* e sua aplicação no sorodiagnóstico da toxocaríase humana**. 2014. -. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROSKAMS, J.; MELLICK, A. S.; RODGERS, L. **Lab Ref: A handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench**, New York: CSHL Press, 2007. 248 p. v. 2.

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

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

SADOYAMA, G.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C. Conceitos básicos de estatística. 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. 2005. p. 141-192.

SANCHEZ-FLORES. Setting the foundation for helminths systems biology: Sequencing technologies, methodologies, and applications. **Systems Biomedicine**, v. 3, p. 5-11, 2013.

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

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

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

SATOH, M.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y.; KOKAZE, A.; SATO, Y. Association of a sex-related difference of *Strongyloides stercoralis*-specific IgG4 antibody titer with the efficacy of treatment of strongyloidiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 107-111, 2004.

SAUGAR, J. M.; MERINO, F. J.; MARTÍN-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; ORTEGA, S.; GÁRATE, T.; RODRÍGUEZ, E. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. **Acta Tropica**, v. 142, p. 20-25, 2015.

SCHÄR, F.; HATTENDORF, J.; KHIEU, V.; MUTH, S.; CHAR, M. C.; MARTI, H. P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis* larvae excretion patterns before and after treatment. **Parasitology**, v. 141, p. 892-897, 2014.

SCHÄR, F.; ODERMATT, P.; KHIEU, V.; PANNING, M.; DUONG, S.; MUTH, S.; MARTI, H.; KRAMME, S. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. **Acta Tropica**, v. 126, p. 89-92, 2013a.

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. 11, e2288, 2013b.

SIBER, G. R.; SCHUR, P. H.; AISENBERG, A. C.; WEITZMAN, S. A.; SCHIFFMAN, G. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. **The New England Journal of Medicine**, v. 303, p. 178-182, 1980.

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

SIDDIQUI, A. A.; KOENIG, N. M.; SINENSKY, M.; BERK, S. L. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. **Parasitology Research**, v. 83, p. 655-658, 1997.

SILES-LUCAS, M. M.; GOTTSTEIN, B. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, p. 575-581, 2003.

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.

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

- SOBLIK, H.; YOUNIS, A. E.; MITREVA, M.; RENARD, B. Y.; KIRCHNER, M.; GEISINGER, F.; STEEN, H.; BRATTIG, N. W. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti* -identification of stage-specific proteases. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, M111.010157, 2011.
- SOTILLO, J.; VALERO, L.; SÁNCHEZ DEL PINO, M. M.; FRIED, B.; ESTEBAN, J. G.; MARCILLA, A.; TOLEDO, R. Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 271-279, 2008.
- SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: GROVE, D. I. (Ed.). **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**. 1 ed. London: Taylor and Francis, 1989. p. 11-84.
- STEINMANN, P.; ZHOU, X.; DU, Z.; JIANG, J.; WANG, L.; WANG, X.; LI, L.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 1-6, 2007.
- STERLA, S.; SATO, H.; NIETO, A. *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 27-34, 1999.
- STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 79, p. 237-248, 1973.
- SUDRÉ, A. P.; SARAMAGO, R. H.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: Importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 173-184, 2006.
- SUDRÉ, A. P.; SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G.; PERALTA, R. H.; MACEDO, H. W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1117-1123, 2007.
- SYKES, A. M.; MC CARTHY, J. S. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides infection*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e955, 2011.
- TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 907-911, 1995.
- TAZIR, Y.; STEISLINGER, V.; SOBLIK, H.; YOUNIS, A. E.; BECKMANN, S.; GREVELDING, C. G.; STEEN, H.; BRATTIG, N. W.; ERTTMANN, K. D. Molecular and functional characterisation of the heat shock protein 10 of *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 149-157, 2009.
- THOMPSON, F. J.; MITREVA, M.; BARKER, G. L.; MARTIN, J.; WATERSON, R. H.; McCARTER, J. P.; VINEY, M. E. An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 142, p. 32-46, 2005.
- TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: chemokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae *in vitro*. **Parasitology International**, v. 54, p. 147-152, 2005a.

TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: thermokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae in vitro. **Parasitology Research**, v. 95, p. 314-318, 2005b.

TSUJI, N.; KAWAZU, S.; NAKAMURA, Y.; FUJISAKI, K. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.55, p.881-883, 1993.

TSUJI, N.; OHTA, M.; FUJISAKI, K. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v.83, p.99-102, 1997.

TURNER, J. D.; FAULKNER, H.; KAMGNO, J.; CORMONT, F.; Van SNICK, J.; ELSE, K. J.; GRENCIS, R. K.; BEHNKE, J. M.; BOUSSINESQ, M.; BRADLEY, J. E. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1768-1775, 2003.

UMEZAWA, E. S.; YASUDA, S.; STOLF, A. M. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, p. 407-413, 1996.

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.

VAIYAVATJAMAI, P.; BOITANO, J. J.; TECHASINTANA, P.; TUNGTRONGCHITR, A. Immunocompromised group differences in the presentation of intestinal strongyloidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 5-8, 2008.

VAN DOORN, H.R., KOELEWYN, R., HOFWEGEN, H., GILIS, H., WETSTEYN, J.C., WISMANS, P.J., SARFATI, C., VERVOORT, T., VAN GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 438-442, 2007.

VARATHARAJALU, R.; PARANDAMAN, V.; NDAO, M.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis* excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. **Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 115-122, 2011.

VASOO, S.; PRITT, B. S. Molecular diagnostics and parasitic disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, p. 461-503, 2013.

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

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. 2007. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook**: the *C. elegans* Research Community. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

VON GUNTEN, S.; SMITH, D. F.; CUMMINGS, R. D.; RIEDEL, S.; MIESCHER, S.; SCHAUB, A.; HAMILTON, R. G.; BOCHNER, B. S. Intravenous immunoglobulin contains a broad repertoire of anticarbohydrate antibodies that is not restricted to the IgG2 subclass. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 1268-1276, 2009.

WANG, L. J.; CAO, Y.; SHI, H. N. Helminth infections and intestinal inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 5125-5132, 2008.

WEATHERHEAD, J. E.; MEJIA, R. Immune response to infection with *Strongyloides stercoralis* in patients with infection and hyperinfection. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 229-233, 2014.

WEINSTOCK, J. V.; SUMMERS, R. W.; ELLIOTT, D. E. Role of helminths in regulating mucosal inflammation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, p. 249-271, 2005.

WOODWARD, M. P.; YOUNG JR, W. W.; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. **Journal of Immunological Methods**, v. 78, p. 143-153, 1985.

YAMASHITA, Y.; OKANO, M.; YOSHINO, T.; HATTORI, H.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.; TAKISHITA, T.; AKAGI, T.; NISHIZAKI, K. Carbohydrates expressed on *Aspergillus fumigatus* induce *in vivo* allergic Th2-type response. **Clinical Experimental Allergy**, v. 32, p. 776-782, 2002.

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

YOU DEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p.32-35, 1950.

ZANCOPE-OLIVEIRA RM1, BRAGG SL, REISS E, WANKE B, PERALTA JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, p. 390-393, 1994.

ZHAO Y.; LIN, Y. H. Whole-cell protein identification using the concept of unique peptides. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 8, p. 33-41, 2010.

ZHUANG, W. Z.; KUBOTA, S.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Characterization of epitopes on a 32 kDa merozoite surface protein of *Theileria sergenti*. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 113-119, 1993.