

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Peptídeos miméticos de antígenos de *Strongyloides venezuelensis* como nova ferramenta no diagnóstico da estrogiloidíase humana e no desenvolvimento de vacinas em modelo experimental

JOSÉ EDUARDO NETO DE SOUSA

Uberlândia
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Peptídeos miméticos de antígenos de *Strongyloides venezuelensis* como nova ferramenta no diagnóstico da estrogiloidíase humana e no desenvolvimento de vacinas em modelo experimental

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.

José Eduardo Neto de Sousa

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Coorientador

Uberlândia

Julho – 2018

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

S725p
2018 Sousa, José Eduardo Neto de, 1990
 Peptídeos miméticos de antígenos de *Strongyloides venezuelensis*
 como nova ferramenta no diagnóstico da estrogiloidíase humana e no
 desenvolvimento de vacinas em modelo experimental [recurso eletrônico]
 / José Eduardo Neto de Sousa. - 2018.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.

Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.480>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Estrogiloidíase. 3. *Strongyloides venezuelensis*.
4. Diagnóstico. I. Cruz, Julia Maria Costa, (Orient.). II. Goulart, Luiz
Ricardo, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
 Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



José Eduardo Neto de Sousa

“Peptídeos miméticos de antígenos de *Strongyloides venezuelensis* como nova ferramenta no diagnóstico da estrogiloidíase humana e no desenvolvimento de vacinas em modelo experimental”

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 30 de julho de 2018.

Fabiana Martins de Paula
 Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula
 IMTSP/USP

Daniela da Silva Nunes
 Dra. Daniela da Silva Nunes
 ICIAG/UFU

Vanessa da Silva Ribeiro
 Dra. Vanessa da Silva Ribeiro
 ICBIM/UFU

Fabiana de A.A. Santos
 Dra. Fabiana de A. Araújo Santos
 INGB/UFU

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

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pela força, coragem, determinação e perseverança durante todos esses anos.

Aos meus pais,

Mônica e José Carlos que no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de imenso carinho e amor os valores da integridade, da perseverança, humildade e determinação. A vocês eu devo a vida e quase tudo daquilo que hoje sou.

E toda minha família,

Em especial aos meus avós José Eduardo, Sebastiana, Otacílio e Ivete, a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar saúde e forças nas dificuldades dessa longa caminhada.

Aos meus pais Mônica e José Carlos que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Pai e Mãe, minhas maiores certezas na vida, a vocês eu agradeço de coração por tudo e por tanto, pela dádiva da vida e por durante toda essa vida, até hoje, terem sido meus pilares, meus exemplos, meus tudo!

Aos meus irmãos Wanderlei, Diego e Karla por serem acima de tudo, meus amigos. A minha família principalmente meus avós paternos José Eduardo e Sebastiana e aos maternos Otacílio e Ivete, por serem exemplos de pessoas humildes e honestas. Aos meus sobrinhos Camila e Vinícius. A todos os meus tios (as) e primos (as). Muito obrigado a todos!

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz pela paciência e dedicação na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste estudo. Pela oportunidade e confiança, por sua competência profissional e por sua forma humana que conduziu minha orientação. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Luiz Ricardo pela coorientação, incentivo e ideias no desenvolvimento deste estudo. Agradeço também pela confiança e sua competência profissional que muito contribuiu para conclusão deste estudo.

A toda equipe do laboratório de Diagnóstico de Parasitoses Edson, Gabriela, Luísa, Camila, Bruna, Vanessa, Guilherme e por aqueles que já saíram Daniela, Lucas, Renata, Nágilla, Henrique, Jéssica e Dayane que se tornaram grandes companheiros e amigos. Agradeço em especial ao Edson, Bruna e Luísa por todo apoio e cumplicidade nos experimentos durante todo esse período.

A equipe do laboratório de nanobiotecnologia por todo apoio, ensinamentos durante os experimentos. Agradeço em especial a Patrícia Terra, Bruna, Emília e Aline. Obrigado!

As pessoas que ao longo do tempo, desde a infância viram meu crescimento enquanto pessoa, enquanto amigo, enquanto profissional e em busca de novos sonhos e horizontes. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida. Thamires, Heloise, Damiana, Marcus Vinicius, Paulo Alexandre, Luiz Eduardo, Gabriel, Eduarda, Eduardo H., Leonardo, Luiz Fernando, Aderso, Eduardo B., Eriká, Flávia, André, Eliézer, Murilo, Luísa, Edson, Gabriela, Camila, Bruna, Renata Moura, Dayane, Renan, Fernando, Marcos, Wid Cuvinel, Bárbara, Nayara, Patrícia, Paula, Nawany, Raíslla, Aretha,

Laylaine, Mário, Arlindo, Aline, Narcisa, Carlos André. Agradeço especialmente ao Marcelo Pires que me ajudou bastante a ver a vida de uma forma mais leve. Obrigado a todos vocês!

Aos funcionários do setor de Parasitologia Vanessa, Juliana, Elaine e aos que já saíram também Scheila, Maria do Rosário e Marcelo.

Aos Professores e secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelos ensinamentos, atenção e disponibilidade.

Aos membros da banca Dr^a. Fabiana Martins de Paula, , Dr^a. Vanessa da Silva Ribeiro, Dr^a. Fabiana de Almeida Araújo Santos, Dr^a. Daniela da Silva Nunes e a Dr^a. Paula de Souza Santos. Agradeço por aceitarem avaliar esse estudo, pela disposição e contribuições para o melhoramento do mesmo.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos que, mesmo não estando aqui citados participaram diretamente ou indiretamente para conclusão da tese.

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei...

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia todo mundo chora
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz
(Almir Sater, Renato Teixeira, 1990).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos peptídeos selecionados para imunização demonstrando a sequência e tamanho dos peptídeos.....	47
Tabela 2 - Títulos (em pfu: <i>plaque-forming unit</i>) de fagos de entrada e saída do <i>biopanning</i>	53
Tabela 3 - Alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados pelo <i>biopanning</i> , realizado pelo programa Clustal Omega. Os dados representam sequências dos clones de fagos ligantes ao peptídeo C10.....	55
Tabela 4 - Reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses (Grupo III, n = 40) por <i>Phage</i> -ELISA para detecção de imunocomplexos de <i>S. stercoralis</i> usando os clones de fagos.	58
Tabela 5 - Contagem diferencial de leucócitos dos os grupos experimentais. Foi realizado contagem de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Pré (Pré-imunização), 1 ^a (15 dias após a primeira infecção), 2 ^a (15 dias após a 2 ^a imunização), d.p.i (dias pós infecção).	68
Tabela 6 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C9 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1 ^o d.p.i até 21 dias após a infecção.	71
Tabela 7 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C9 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1 ^o d.p.i até 21 dias após a infecção.....	74
Tabela 8 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1 ^o d.p.i até 21 dias após a infecção.....	77
Tabela 9 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1 ^o d.p.i até 21 dias após a infecção.....	80
Tabela 10 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9 e C10 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1 ^o d.p.i até 21 dias após a infecção.....	83

Tabela 11 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9 e C10 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.....86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*. o – ovos. mvl – macho de vida livre. fvl – fêmea de vida livre. lr – larva rhabditoide. lf – larva filarioide. fp – fêmeas partenogênicas (COSTA-CRUZ, 2016). 20
- Figura 2** - Respostas imunes na infecção por *Strongyloides stercoralis* em função do tempo após o início da infecção. 25
- Figura 3** - Estratégia de *biopanning* para a seleção de clones de peptídeos expressos em fagos ligantes ao peptídeo sintético C10. Seleção negativa foi realizada com soro albumina bovina (BSA) e a seleção positiva com o peptídeo C10. 38
- Figura 4** - Delineamento experimental da imunização e infecção desafio. 49
- Figura 5** - Exemplo da titulação dos fagos obtidos nos *rounds* de seleção. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) pelos fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase. A, B, C e D representam as titulações 10^{-1} a 10^{-4} , respectivamente. 52
- Figura 6** - Avaliação em *Phage-ELISA* da reatividade dos 96 clones de fagos selecionados utilizando o peptídeo C10. Em verde está destacado os clones com maiores valores de DO considerados com maior afinidade ao peptídeo C10. DO – densidade óptica a 492 nm. 54
- Figura 7** - ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos selecionados contra o peptídeo C10 e BSA. DO – densidade óptica a 492 nm. BSA – controle negativo. 56
- Figura 8** - Detecção de imunocomplexo por *phage-ELISA*. O ensaio foi realizado utilizando fagos ligantes ao peptídeo sintético C10 em amostra de soro de pacientes positivos para estrogiloidíase (n = 40), saudáveis (n = 40) e com outras parasitoses (n = 40), fago C4 (A) e fago G8 (C). Curvas (ROC) área sob a curva (AUC), indicando sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), acurácia (Acc) e índice de Youden (J), fago C4 (B), fago G8 (D). **** - p <0,0001..... 57
- Figura 9** - Ensaio ELISA competitivo. As placas foram sensibilizadas com peptídeo sintético C10 (1 μ g/poço) e cada clone de fagos selecionados (os clones C4 e G8 anti-C10) foram pré-incubadas com soros de pacientes com estrogiloidíase em diluições crescentes (40, 80, 120, 160 e 200). Um poço não foi adicionado soro (sem soro - S/S) e considerado controle negativo. * - p <0,01, ** - p <0,001. 59
- Figura 10** - ELISA indireto para avaliação da reatividade dos clones selecionados frente ao antígeno de *S. venezuelensis*. Reconhecimento antigênico. Clone de fago C4, G8 e fagos selvagens foram utilizados. 59
- Figura 11** - Ligação dos fagos anti-C10 em cortes de *S. venezuelensis* por Reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Clone C4 (A, B e C), clone G8 (D, E e F), fagos selvagens (G, H e I) e PBS (J, K e L). Coluna 1 (vermelho): azul Evans contrastado; Coluna 2 (verde): isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna 3: resultante da fusão das colunas 1 e 2 (*merge*). 61

Figura 12 - Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) dos fagos anti-C10 em cortes de *T. crassiceps*. Clone C4 (A, B e C), clone G8 (D, E e F), fagos selvagens (G, H e I) e PBS (J, K e L). Coluna 1 (vermelho): azul Evans contrastado; Coluna 2 (verde): isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna 3: resultante da fusão das colunas 1 e 2 (*merge*).....62

Figura 13 - Peso corporal total dos animais. Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média.65

Figura 14 - Contagem global de leucócitos. Valor de referência 4000 – 12000/Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média.67

Figura 15 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo com alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Comparação da contagem de ovos por gramas de fezes dos ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * p < 0,1; ** p < 0,01.71

Figura 16 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e

infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$ 74

Figura 17 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes aos grupos alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$ 77

Figura 18 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$ 80

Figura 19 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes aos grupos alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$ 83

Figura 20 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$ 86

Figura 21 - ELISA de cinética de detecção de anticorpos IgG no soro de ratos realizado com amostras quinzenais. Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média..... 88

RESUMO

A estrogiloidíase é uma infecção parasitária em humanos causada por *Strongyloides stercoralis* e apresenta ampla distribuição geográfica com predominância em áreas tropicais e subtropicais. O diagnóstico é dificultado pela intermitente eliminação de larvas nas fezes e o grande número de indivíduos assintomáticos. Assim, a detecção de imunocomplexos no soro dos pacientes com estrogiloidíase pode ser uma estratégia para detectar infecção ativa precoce em pacientes com estrogiloidíase e o desenvolvimento de vacinas é uma ótima estratégia de saúde pública. O objetivo deste estudo foi utilizar a tecnologia de *phage display* para selecionar clones de fagos ligantes ao peptídeo sintético C10, aplicação desses ligantes na detecção de imunocomplexos em soros de pacientes com estrogiloidíase humana e verificar a utilização de peptídeos miméticos de antígenos de *S. venezuelensis* em formulações vacinais no controle da estrogiloidíase experimental. A seleção clones ligantes ao C10 foi realizada por *phage display*, posteriormente os fagos foram titulados e seus DNA sequenciados. Os clones C4 e G8 foram selecionados e utilizados na detecção de imunocomplexo por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase e na detecção de antígenos de *S. venezuelensis* por ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para avaliar o potencial vacinal foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias cada, seguidas de uma infecção desafio com larvas infectantes de *S. venezuelensis* (15 dias após a última imunização). Para imunização dos animais foram utilizados os peptídeos C9 e C10 expressos na superfície de bacteriófago M13 (fagos M13) e fagos M13 selvagens. Foram utilizados dois tipos de adjuvantes: hidróxido de alumínio (alúmen) e saponina. Titulações do soro foram realizadas durante todo o experimento para acompanhar a soroconversão dos títulos de IgG. Contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) foi realizada durante os 21 dias de infecção. O fago C4 apresentou maior desempenho diagnóstico: sensibilidade de 83%, especificidade de 89% com AUC de 0,953 e índice de Youden 0,713. Ao comparar os resultados do 8º dia dos animais imunizados com os clones C9, C10 e a combinação ambos (C9 e C10) juntamente com alúmen, observou-se que as taxas de redução de ovos nas fezes foram de 50, 50 e 78%, respectivamente. Enquanto os ratos imunizados utilizando o adjuvante saponina a redução foi de 59, 55 e 80%, respectivamente. Os grupos imunizados com a combinação dos clones C9+C10 (alúmen e saponina) apresentaram maior redução de OPG. Conclui-se que a técnica de *phage display* foi eficiente na seleção de clones específicos ao peptídeo C10. Os fagos ligantes ao peptídeo sintético C10 detectaram imunocomplexo em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase com boa sensibilidade e especificidade. Os clones C4 e G8 reconhecem antígenos de *S. venezuelensis*. A imunização com fagos expressando tanto o peptídeo C9 quanto C10 com ambos adjuvantes foram eficientes na redução da carga parasitária de *S. venezuelensis* em ratos experimentalmente infectados. Os peptídeos miméticos de antígenos de *S. venezuelensis* podem ser utilizados como nova ferramenta no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana e no desenvolvimento de vacinas em modelo experimental.

Palavras chaves: *Phage display*; Estrogiloidíase humana; *Strongyloides venezuelensis*; Diagnóstico; Vacina.

ABSTRACT

Mimetic peptides of *Strongyloides venezuelensis* antigens as a new tool in the diagnosis of human strongyloidiasis and in the development of vaccines in an experimental model

Strongyloidiasis is a chronic human parasitic infection caused by *Strongyloides stercoralis* and presents a wide geographical distribution with predominance in tropical and subtropical areas. The diagnosis is difficult by due to intermittent elimination of larvae in the faeces and the large number of asymptomatic individuals. Thus, detection of serum immune complexes in patients with strongyloidiasis may be a strategy to detect early active infection in patients with strongyloidiasis. The diagnosis of infected persons and the development of vaccines would be an excellent strategy of public health, favoring the breakdown of the biological cycle of the parasite. The aim of this study was to use phage display technology to select clones of phages binding the synthetic peptide C10, application of these ligands in the detection of immunocomplexes in sera of patients with human strongyloidiasis and to verify the use of mimetic peptides of *S. venezuelensis* antigens in vaccine formulations in the control of experimental strongyloidiasis. The selection of clones binding to C10 was performed by phage display, later the phages were titrated, and their DNA sequenced. C4 and G8 clones were selected and used in detection immune complexes by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in serum samples from patients with strongyloidiasis and in the detection of *S. venezuelensis* antigens by ELISA and indirect immunofluorescence (IFAT). To evaluate vaccine potential, two immunizations were performed at 15-days intervals each, followed by a challenge infection with *S. venezuelensis* infective larvae (15 days after the last immunization). For animal's immunization were used the clones C9 and C10 and wild phage M13. Two types of aluminum hydroxide (alum) and saponin adjuvants were used. Serum titers were performed throughout the experiment to monitor seroconversion of IgG titers. Egg count per gram of faeces (EPG) was performed during the 21 days of infection. The clones C4 and G8 more reactive to the C10 peptide. The C4 phage presented the highest diagnostic performance: sensitivity of 83%, specificity of 89% with AUC of 0.953 and Youden index 0.713. When comparing the 8th day results of the animals immunized with alum and clones C9, C10 and the combination of both (C9 and C10), it was observed that the egg reduction rates in the faeces were 50, 50 and 78%, respectively, while the rats immunized with saponin adjuvant the reduction was 59, 55 and 80%, respectively. The groups immunized with the combination of C9 + C10 (alum and saponin) showed greater reduction of EPG. In conclusion, the phage display technique was effective in selecting specific clones of the C10 peptide. Anti-C10 phages can detect immune complexes in serum samples from patients with strongyloidiasis with reasonable sensitivity and specificity. Clones C4 and G8 recognize *S. venezuelensis* antigens. Immunization with phage expressing both C9 and C10 peptide with both adjuvants was effective in reducing the *S. venezuelensis* EPG. Mimetic peptides of *S. venezuelensis* can be used as a new tool in the serological diagnosis of human strongyloidiasis and in the development of vaccines in an experimental model.

Key-words: *Phage display*; Human strongyloidiasis; *Strongyloides venezuelensis*; Diagnostic; Vaccine.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO	17
1.1 - Aspectos morfológicos do gênero <i>Strongyloides</i>	18
1.2 - Vias de transmissão e ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i>	19
1.3 - Epidemiologia da estrogiloidíase humana	22
1.4 - Sintomatologia da estrogiloidíase humana	23
1.5 - Resposta imune do hospedeiro na estrogiloidíase humana e animal	24
1.6 - Diagnóstico da estrogiloidíase	26
1.7 – Tratamento	28
1.8 – <i>Phage display</i>	29
1.9 - Modelos animais no estudo da estrogiloidíase	30
1.10 - Desenvolvimento de vacinas	31
2 – OBJETIVOS	34
Parte 1 – Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10	34
2.1 – Objetivo geral.....	34
2.1.1 – Objetivos específicos.....	34
Parte 2 – Potencial vacinal	34
2.2 – Objetivo geral.....	34
2.2.1– Objetivos específicos.....	35
3 – MATERIAL E MÉTODOS	36
Parte 1 - Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10	36
3.1.1 - Considerações éticas	36
3.1.2 - Amostras de soro.....	36
3.1.3 – <i>Phage display</i>	37
3.1.4 – Titulações dos fagos	39
3.1.5 – Amplificação e purificação dos clones de fagos	39
3.1.6 – Pré-validação por <i>Phage-ELISA</i> dos clones selecionados.....	40
3.1.7 – Extração de DNA dos clones de fagos	40
3.1.8 – Sequenciamento de DNA dos fagos e dedução da sequência	41
3.1.9 – Seleção de fagos por ELISA	41
3.1.10 – Utilização de fagos na detecção de imunocomplexo por ELISA sanduíche	42
3.1.11 - Ensaio ELISA de competição	42
3.1.12 - Obtenção das larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	43
3.1.13 - Extrato de salino de <i>S. venezuelensis</i>	43
3.1.14 - Ensaio ELISA indireto para reconhecimento antigênico	44
3.1.15 - Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	44
3.1.16 – Normas de Biossegurança	44
3.1.17 – Análises estatísticas	45

Parte 2 - Potencial vacinal	45
3.2.1 - Aspectos éticos.....	45
3.2.2 - Animais	45
3.2.3 - Amplificação e purificação dos fagos	47
3.2.4 - Obtenção das larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	48
3.2.5 - Imunização dos animais e infecção desafio	48
3.2.6 – Pesagem dos ratos	49
3.2.7 - Contagem global e diferencial de leucócitos	49
3.2.8 - Contagem de ovos por grama de fezes.....	50
3.2.9 - ELISA indireto para verificação dos títulos de anticorpos IgG	50
3.2.10 - Normas de Biossegurança.....	51
3.2.11 - Análises estatísticas.....	51
4 – RESULTADOS	52
Parte 1 - Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10	52
4.1 - <i>Biopanning</i>	52
4.2 - Triagem por <i>Phage</i> -ELISA.....	53
4.3 - Sequenciamento do DNA dos fagos selecionados.....	55
4.4 - Detecção de imunocomplexo em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase	56
4.5 - Validação dos clones ligantes ao peptídeo C10 e reconhecimento antigênico.....	58
Parte 2 - Potencial vacinal	63
4.1 - Pesagem dos animais	63
4.2 - Contagem global e diferencial de leucócitos	65
4.3 - Contagem de ovos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> por gramas de fezes	69
4.4 - Cinética para detecção de IgG por ELISA	87
5 – DISCUSSÃO	89
6 – CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98

1 – INTRODUÇÃO

O nematoide *Strongyloides stercoralis* causa a estrogiloidíase humana, helmintíase transmitida pelo solo, sendo o homem a principal fonte de infecção e seu principal reservatório. Apresenta ampla distribuição geográfica havendo predominância em áreas tropicais e subtropicais de modo que o risco de infecção pode estar ligado diretamente às condições de higiene do indivíduo (WU et al., 2012; BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016). Esta parasitose pode atingir 100 milhões de indivíduos e as taxas de prevalência podem representar valores maiores do que os dados atuais, principalmente devido às dificuldades de seu diagnóstico (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; WHO, 2018).

Esta parasitose pode permanecer por anos de forma assintomática em seu hospedeiro, induzindo a fase crônica da doença com o estabelecimento de um ciclo de autoinfecção. Entretanto, em pacientes imunossuprimidos a infecção pode induzir a síndrome de hiperinfecção, e conseqüentemente a disseminação, podendo ser fatal nesses casos (PAGE; JUDD; BRADBURRY, 2018). Pelo fato de não desenvolver sintomas em cerca de 50% dos pacientes imunocompetentes infectados e por não possuir ferramentas precisas de diagnóstico (BECKER et al., 2011), a doença não possui um mapeamento frequente de epidemiologia no mundo, sendo então incluída no grupo de doenças negligenciadas (WHO, 2018).

O diagnóstico e a terapia efetiva são essenciais para erradicar a infecção, o risco de continuação do ciclo biológico e o risco de vida em pacientes imunossuprimidos. Portanto, os métodos diagnósticos precisam ser altamente sensíveis e específicos. Os exames parasitológicos de fezes são comumente usados em estudos de prevalência, mas são inadequados pela baixa sensibilidade. Os métodos de concentração, a técnica de Baermann e a cultura da placa de ágar apresentam melhor sensibilidade quando comparados com outras técnicas parasitológicas, mas ainda assim com insatisfatória sensibilidade devido a intermitente eliminação de larvas nas fezes. Testes sorológicos demonstraram maior sensibilidade embora, alguns autores tenham preocupações sobre sua especificidade e com a reatividade cruzada com outros helmintos (BUONFRATE et al., 2015).

A detecção de imunocomplexos em amostras convencionais de soro e saliva de pacientes com estrogiloidíase pode ser importante para o diagnóstico de estrogiloidíase ativa (BOSQUI et al., 2017). Na estrogiloidíase experimental a detecção de imunocomplexos foi bem-sucedida em ratos imunocompetentes e imunossuprimidos demonstrando que o complexo antígeno e anticorpo pode servir como um marcador para a atividade da doença (GONÇALVES et al., 2016). Assim, a detecção de imunocomplexos no soro dos pacientes com estrogiloidíase

pode ser uma estratégia para detectar infecção ativa precoce em pacientes com estrogiloidíase, principalmente em indivíduos assintomáticos.

O tratamento com ivermectina alcança taxa de aproximadamente 100% de cura na dose de 200 µg/kg (SCHÄR et al, 2013.). No entanto, o uso de medicamentos anti-helmínticos não impede a reinfeção pelo parasito (KROLEWIECKI et al., 2013). Nenhuma estratégia de saúde pública foi desenvolvida para controlar a estrogiloidíase (WHO, 2018). Desta forma, o diagnóstico de pessoas infectadas e o desenvolvimento de vacinas seria uma ferramenta promissora de saúde pública, impedindo a disseminação do parasito.

1.1 - Aspectos morfológicos do gênero *Strongyloides*

Para a maioria dos nematoides que parasitam o trato gastrointestinal dos vertebrados, parasitos machos e fêmeas vivem no intestino e após a copula as fêmeas eliminam ovos na luz intestinal e estes são excretados pelas fezes do hospedeiro. O gênero *Strongyloides* possui a peculiaridade de ser o único capaz de realizar um duplo ciclo evolutivo. As fêmeas são partenogénicas e somente elas são parasitas, localizam-se no intestino delgado e produzem larvas rhabditoides que no meio externo originam machos e fêmeas de vida livre (VINEY; LOCK, 2015).

As fêmeas partenogénicas medem aproximadamente 2 mm de comprimento e são filiformes. O aparelho digestório é simples, esfago filariforme e ocupa cerca de um terço do comprimento do corpo. A vulva está localizada no ventre no terço médio do corpo partindo para o útero que é anfidelfo. No útero são encontrados os ovidutos que possui um número reduzido de ovos, cerca de 6 a 9 ovos em diferentes estádios de maturação que estão dispostos enfileirados (MORAES, 1948; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

As fêmeas de vida livre são fusiformes possuem cutícula fina, translúcida, delgada e estriada transversalmente. Medem aproximadamente 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de diâmetro. A vulva está localizada na região mediana do corpo, com dois lábios conspícuos. Os úteros são anfidelfos, ocupando grande parte do parasito. O oviduto está ligado aos ovários, dobrados no sentido contrário aos úteros e o número de ovos é maior em relação às fêmeas partenogénicas (MORAES, 1948; GROVE, 1996; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

Os machos de vida livre possuem corpo cilíndrico e fusiforme, com extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Medem aproximadamente de 0,7 a 0,9 mm de comprimento por 0,04 mm de diâmetro. O sistema reprodutor é composto pelos

testículos que ocupam grande parte do corpo, seguidos da vesícula seminal, canais deferente e ejaculador, abrindo em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios que se deslocam sustentados por uma estrutura quitinizada, denominada gubernáculo (MORAES, 1948; GROVE, 1996; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

As larvas rabditoides (L1 e L2) são encontradas nas fezes ou em fluídos intestinais. Medem cerca de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de diâmetro. O sistema digestório é composto por uma boca pequena, o esôfago é rabditoide, formado por dois bulbos: um anterior alongado e cilíndrico, o outro posterior e granuloso. Possui também um primórdio genital localizado no meio do corpo, formado por um aglomerado de células (MORAES, 1948; GENTA, 1992; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

As larvas filarioides (L3) são a forma infectante, possuem cauda pontiaguda, são radialmente constrictas, alongadas e finas. Medem de 0,35 a 0,5 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de diâmetro. O esôfago é filarioide ocupando quase metade do comprimento do nematoide, o intestino é longo e estreito terminado em uma abertura anal (MORAES, 1948; GENTA, 1992; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

1.2 - Vias de transmissão e ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*

O nematoide *S. stercoralis* possui ciclo de vida complexo dividido em duas fases principais: uma no meio externo e outra no meio interno (Figura 1). A fase externa ocorre no meio ambiente e os adultos (macho e fêmea) são de vida livre. A fase interna acontece dentro do hospedeiro no qual somente as fêmeas partenogênicas são parasitas (COSTA-CRUZ, 2016; JOURDAN et al., 2018).

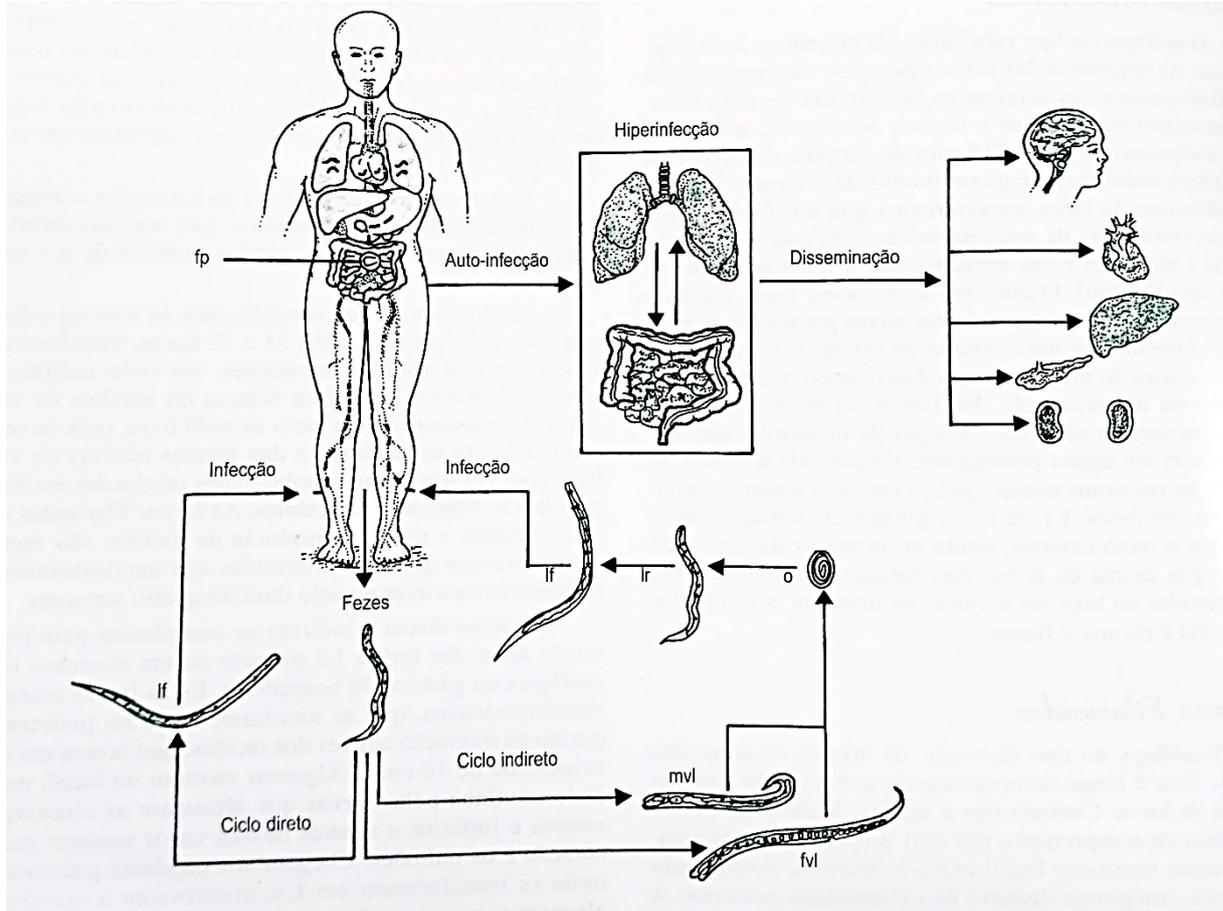


Figura 1 - Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*. o – ovos. mvl – macho de vida livre. fvl – fêmea de vida livre. lr – larva rabditoide. lf – larva filarioide. fp – fêmeas partenogênicas (COSTA-CRUZ, 2016).

A transmissão da doença ocorre pela penetração ativa das larvas L3 por via cutânea em seu hospedeiro (Figura 1). Logo após, entram na corrente sanguínea e migram para o pulmão, ultrapassam os capilares sanguíneos e penetram nos alvéolos sofrendo uma muda para o estágio L4. Em seguida, se dirigem para faringe, onde são deglutidas chegando no intestino delgado, onde maturam em fêmeas partenogênicas. No intestino delgado elas começam a produzir ovos e assim que adquirem maturidade, eles eclodem liberando larvas no estágio L1 que migram para o intestino grosso transformando em L2 e são eliminadas pelas fezes. No meio ambiente desenvolvem em machos ou fêmeas de vida livre ou em L3. Existem três vias de desenvolvimento distintas pelas quais as larvas L3 podem seguir (GENTA, 1992; VINEY; LOCK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016; PAGE; JUDD; BRADBURRY, 2018).

As larvas assim que deixam o hospedeiro humano juntamente com as fezes, podem no meio externo seguir um ciclo direto e outro indireto (Figura 1). No ciclo externo direto, as larvas rabditoide em primeiro estágio (L1) sofrem muda e desenvolvem em larvas rabditoide de segundo estágio (L2), depois sofrem outra muda e tornam-se larvas filarioide de terceiro estágio infectantes (L3i). As L3i ativas podem sobreviver em um ambiente adequado por até

duas semanas até encontrar um novo hospedeiro. No ciclo externo indireto as larvas deixam o hospedeiro humano pelas fezes sofrem quatro mudas até se tornarem fêmeas e machos adultos de vida livre rhabditiformes. Os ciclos direto e indireto se completam pela penetração ativa das larvas L3 na pele ou mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro. Estas larvas secretam metaloproteases, que as auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos, que ocorre numa velocidade de 10 cm por hora (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016; PAGE; JUDD; BRADBURY, 2018).

No ciclo interno denominado autoinfecioso as larvas rhabditoides ainda na luz intestinal desenvolvem-se em larvas L3 causando a reinfecção no indivíduo, levando a infecções crônicas e duradouras (GENTA, 1992; COSTA-CRUZ, 2016; PAGE; JUDD; BRADBURY, 2018). A autoinfecção é uma característica da espécie *S. stercoralis*, que acelera o desenvolvimento da progênie larval das fêmeas parasitas transformando as larvas L1 e L2 em L3 infectantes no interior do intestino e logo em seguida penetram ativamente nos tecidos do hospedeiro. Quadros recorrentes de autoinfecção fazem aumentar o número de parasitos no hospedeiro, o que pode levar o desenvolvimento do quadro de hiperinfecção que pode levar a disseminação de larvas L3 para vários tecidos e órgãos do hospedeiro (Figura 1). Caso não haja tratamento a disseminação para múltiplos órgãos pode ser fatal para o hospedeiro (NUTMAN, 2017).

Outra forma de transmissão que tem grande importância é via doadores de órgãos (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017). A transmissão da infecção por *S. stercoralis* após o transplante de órgãos tem sido relatada, em doadores que tinham histórico de viagens às regiões endêmicas de *S. stercoralis* no mundo (NUTMAN, 2017; MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017). A maioria das infecções por *S. stercoralis* pós-transplante resulta da reativação de uma infecção crônica (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017). Os receptores de transplantes de órgãos sólidos são imunossuprimidos e por isso desenvolvem formas severas da estrogiloidíase após recebimento de um órgão infectado (KIM et al, 2016).

Há ainda outra via de transmissão, mas pouco conhecida e discutida que é a transmissão transmamária, relatados em murinos, caninos, seres humanos, suínos e em equinos (VINEY; LOCK, 2015).

1.3 - Epidemiologia da estrogiloidíase humana

Estima-se que a prevalência global da doença, seja entre 10% e 40% da população (SCHÄR et al., 2013) infectando aproximadamente 100 milhões de pessoas, no entanto, dados precisos sobre prevalência real ainda são desconhecidos em países endêmicos (WHO, 2018). Em países com poucos recursos sócios econômicos a taxa de infecção por *S. stercoralis* possa atingir 60% (SCHÄR et al., 2013). No entanto, esses dados podem ser subestimados, pois muitos aspectos epidemiológicos e de prevalência da infecção são desconhecidos, ou mal compreendidos tanto nacionalmente como em outros países (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Outro fator que favorece com que os dados sejam subestimados é a confirmação da doença, uma vez que a baixa e irregular excreção das larvas dificulta o diagnóstico parasitológico fazendo com que em muitas regiões a prevalência de *S. stercoralis* permaneça sem informação (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2016).

De acordo com a prevalência a estrogiloidíase foi dividida em três categorias sendo: esporádica (< 1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES; DREYER, 1993). Em estudo de revisão realizado por Paula e Costa-Cruz (2011) foi constatado, por meio de diagnósticos parasitológicos e sorológicos que o Brasil possui ocorrência de 5,5%, caracterizando o país como hiperendêmico para *S. stercoralis*.

A estrogiloidíase é endêmica em países tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais, como umidade e temperatura são favoráveis para o desenvolvimento do parasito. (WHO, 2018). Nessas regiões, a exposição à infecção pelo helminto está associada às condições sanitárias. Mas também a doença ocorre em países com climas temperados nos quais a doença está associada com imigrantes e refugiados oriundos de regiões endêmicas. Os principais grupos de risco para a estrogiloidíase são imigrantes, refugiados, viajantes, veteranos de guerra, pessoas que trabalham expostos ao solo (BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016), pessoas com desnutrição crônica, alcoolistas, viajantes, pessoas com câncer, diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência renal crônica (HENRIQUEZ-CAMACHO et al., 2016).

Estudos com imigrantes tem se destacado em países desenvolvidos principalmente nos Estados Unidos da América (OSTERA; BLUM, 2016) e Espanha (MARTINEZ-PEREZ et al., 2018; PACHECO-TENZA et al., 2018). Assim nesses países sugerem que programas de triagem devem ser implementados, especialmente em pacientes imunossuprimidos ou em pacientes sob tratamento crônico com corticosteroides (OSTERA; BLUM, 2016; PACHECO-TENZA et al., 2018).

1.4 - Sintomatologia da estrogiloidíase humana

Na maioria dos indivíduos infectados a estrogiloidíase ocorre de forma assintomática (WHO, 2018). Os sintomas e evolução da doença são determinados pela interação entre hospedeiro e o parasito. Em pessoas imunocompetentes, a doença não é fatal, mas em pacientes imunodeprimidos pode causar a hiperinfecção o que predispõe e agrava a doença alterando a forma da infecção (NUTMAN, 2017) sendo letal em mais de 80% dos casos (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017). A estrogiloidíase possui uma gama de manifestações clínicas (NUTMAN, 2017), sendo os sintomas mais comuns erupções cutâneas, sintomas pulmonares e gastrointestinais (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015).

A fase aguda é caracterizada principalmente por sintomas cutâneos e pulmonares. Assim que as larvas entram em contato com a pele provocam coceiras no local da penetração. Após 24 h da penetração pode se observar edema, urticária e petéquias sendo os pés os mais comumente atingidos. A gravidade das lesões depende do número de larvas e da hipersensibilidade do paciente. Além disso, febre baixa, mal-estar leve e eosinofilia podem aparecer, por alguns dias (PUTHIYAKUNNON et al., 2014; NUTMAN, 2017)

Aproximadamente uma semana depois, as larvas que migram pelos pulmões e pelas vias traqueobrônquicas podem irritar a garganta, causando tosse e síndrome de Löffler. Durante a migração das larvas L3 para os pulmões pode ocorrer hemorragias nos alvéolos. Podem aparecer sintomas como dispneia, sibilos, hemoptise juntamente com abscesso pulmonar e broncopneumonia (VIJAYAN, 2009; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015).

Três semanas após a infecção, as larvas entram nas criptas intestinais e a infecção se torna crônica. Nesse estágio, a estrogiloidíase é assintomática em cerca de dois terços dos pacientes (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Os sintomas gastrointestinais incluem dor abdominal, náuseas, distensão abdominal, má absorção, diarreia, hipotonia generalizada e edema. Quando analisados exames radiográficos pode-se detectar que os diâmetros do lúmen e do intestino delgado podem estar aumentados (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

A síndrome de hiperinfecção pode levar a quadros de disseminação, um dos mais severos desta infecção (NUTMAN, 2017). A disseminação destes parasitos para outros órgãos do corpo pode induzir a sepse, uma vez que as larvas transportam em sua cutícula bactérias gram-negativas para a circulação sanguínea, ou estas bactérias podem ainda entrar na circulação pelas úlceras intestinais ocasionadas pelas larvas. A forma disseminada e sepse são as principais causas de mortalidade da doença (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN 2015).

Na forma disseminada pode ocorrer manifestações raras no sistema nervoso central (NUTMAN, 2017), assim que as bactérias entram na corrente sanguínea e atingem o sistema nervoso central pode causar meningite gram-negativa. Os sinais de meníngeos são a característica clínica mais comum nesses pacientes e o líquido espinhal cerebral mostra parâmetros de meningite asséptica ou características de meningite gram-negativa (WOLL; GOTUZZO; MONTES, 2013).

1.5 - Resposta imune do hospedeiro na estrogiloidíase humana e animal

A sobrevivência de helmintos no hospedeiro durante longos períodos de tempo é o resultado de um processo dinâmico de adaptação e co-evolução o hospedeiro e o parasito. No entanto, a infecção por helmintos causa danos aos tecidos do hospedeiro, induzindo o recrutamento de várias células do sistema imune incluindo as células do sistema imune inato como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos e mastócitos. Essas células são capazes de secretar fatores solúveis, que estimulam mecanismos efetores que dependem dos diferentes locais que esses parasitos habitam (MOTRAN et al., 2018). Os mecanismos relacionados a resposta imunológica humana na infecção por *S. stercoralis* ainda não foram estudados com grandes detalhes. A maioria dos conhecimentos sobre resposta imunológica foi obtido em modelos animais, sugerindo a participação da resposta imunológica inata e adaptativa na estrogiloidíase (BRELOER; ABRAHAM, 2017; NUTMAN, 2017).

A proteção contra helmintos intestinais está associada diretamente com perfil de respostas de linfócitos T *helper* (CD4⁺) 2 (Th2) por meio da ativação de vários mecanismos efetores na interface parasito-hospedeiro (CORTÉS et al., 2017). A infecção por *S. stercoralis* é caracterizada por uma regulação dependente de antígeno do parasito por células Th1, Th2 e Th17 monofuncionais e de função dupla (ANURADHA et al., 2015). Recentemente foi observado que o perfil Th9 também está relacionado com a estrogiloidíase (REITZ et al., 2018).

Na infecção por *Strongyloides* spp. observa-se uma maior resposta Th2 clássica que culmina em diferentes funções efetoras e associada à proteção do hospedeiro (NUTMAN, 2017). A infecção por *S. stercoralis* é caracterizada por alterações nos números absolutos de subgrupos de células T CD4⁺ e nos níveis das interleucinas (IL) IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (ANURADHA et al., 2015).

Na fase aguda assim que as larvas L3 infectantes entram na pele ativam uma variedade de tipos celulares diferentes, tais como células linfoides inatas, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, eosinófilos e basófilos / mastócitos. Inicialmente o parasito induz a diferenciação de um pequeno número de efetores Th1/Th17 e um número relativamente maior de células Th2 que juntamente com a imunoglobulina E (IgE), pode levar à morte de alguns dos parasitos. No início do período de latência há aumento das células CD4 + Th2/Th9, inibição de células Th1/Th17 e a indução de macrófagos alternativamente ativados. Com a evolução da infecção crônica de longa duração, existe uma aumento de células T reguladoras (Tregs) produtoras de IL-10 ou fator de transformação do crescimento beta (TGF β) e diminuição do perfil Th2/Th9 (NUTMAN, 2017). Em modelo animal o sucesso da infecção por *S. venezuelensis* foi correlacionado com a indução transitória de IL-5 associada ao perfil Th2 e liberação de IL-10 (Figura 2), (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

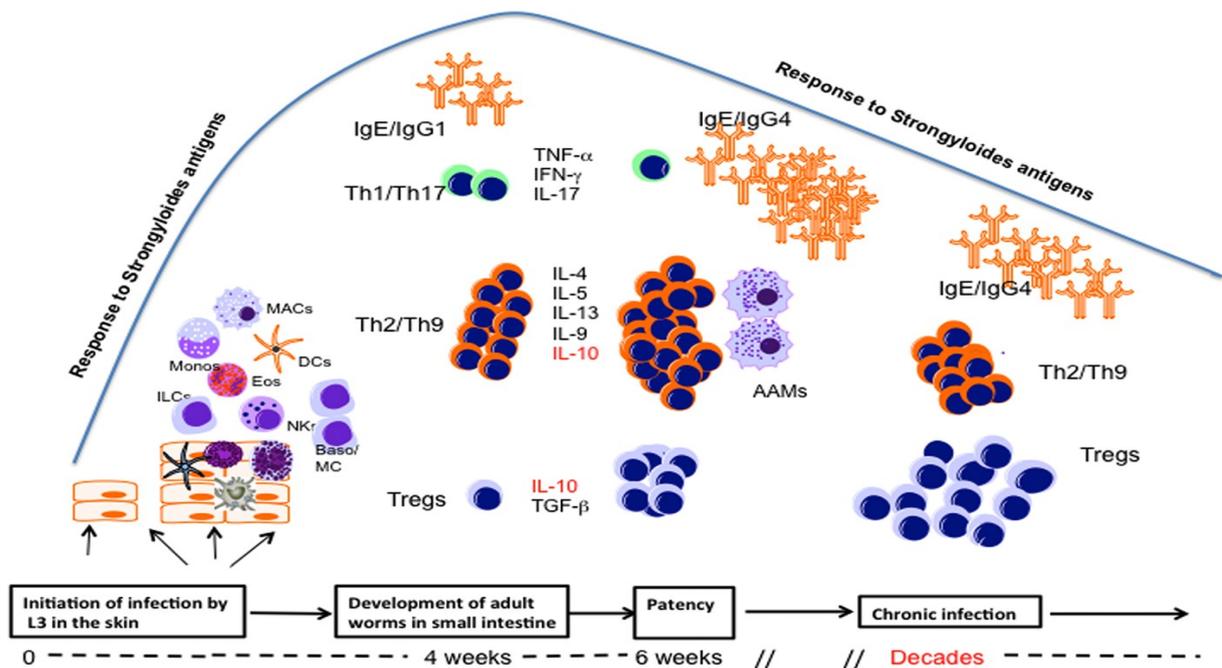


Figura 2 – Respostas imunes na infecção por *Strongyloides stercoralis* em função do tempo após o início da infecção.

Em modelo experimental eosinófilos e neutrófilos atuam na morte de *S. stercoralis* na imunidade inata e desempenham um papel essencial na interface entre respostas inatas e adaptativas. Antígenos de *Strongyloides* ativam eosinófilos, e estes atuam como células apresentadoras de antígenos (APC) e estimulam a produção de citocinas Th2 antígeno específicas, incluindo interleucina IL-4 e IL-5. A morte de larvas é auxiliada por neutrófilos, mediada por IL-4, que por sua vez induz a produção de IgE, imunoglobulina G4 (IgG4) e IL-8

por linfócitos B ativados. A produção de IgE provoca a degranulação de mastócitos e aumenta a migração de eosinófilos, enquanto a IL-5 estimula o crescimento e ativação dos eosinófilos (WEATHERHEAD; MEJIA, 2014; BRELOER; ABRAHAM, 2017; NUTMAN, 2017).

A migração de larvas infectantes de *S.venezuelensis* nos tecidos do pulmão induz a produção de IL-33 provocando a produção de IL-5 e IL-13 que subsequentemente promovem o controle do parasito e o início da resposta de Th2 com produção de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-9. Já IL-4 desencadeia a produção de IgG1 e diferenciação de células B e IgE. IgG e IgE, bem como IL-3 e IL-9 ativam os mastócitos que interferem na fixação das fêmeas de *S. venezuelensis* no intestino e promove expulsão parasito. A expulsão da fêmea partenogenéticas de *Strongyloides* spp. é dependente de mastócitos ativados mediadas por IgE e IgG específico pela FcεR e FcγR, mas o mecanismo exato da expulsão do parasito ainda precisa ser elucidado (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

Na doença crônica, o parasito induz o sistema imunológico a produção de imunoglobulinas IgE, IgG e suas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (NUTMAN, 2017). A imunoglobulina mais detectada é a IgG e sua detecção no soro pode permanecer por longo período, mesmo após ao tratamento terapêutico. Em pacientes imunocompetentes que apresentam a doença são detectados níveis elevados de IgE, o que indica proteção, enquanto em pacientes imunocomprometidos apresentam níveis elevados de IgG₄ e de IgE total apresentam-se normais (DE BONA; BASSO, 2008).

A utilização de corticosteroides pode atuar na imunidade das seguintes formas: supressão da proliferação de eosinófilos e inibição da resposta de mastócitos. Aumento da apoptose dos linfócitos Th2, aumento de substâncias semelhantes a ecdisteroides que aceleram o desenvolvimento de larvas rabditoides em filarioides e aumentam a fecundidade das fêmeas partenogenéticas (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017).

1.6 - Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é difícil, uma vez que os sinais clínicos não são específicos (BUONFRATE et al., 2015). O diagnóstico da estrogiloidíase só pode ser confirmado por exames específicos, que podem ser por métodos diretos como exame parasitológico de escarro, métodos coprológicos, biópsias e necropsias. Também pode ser realizado por métodos indiretos como hemograma e ensaios imunológicos (BAVA et al., 2013).

Os exames parasitológicos de fezes são utilizados com a finalidade de detectar os parasitos em diferentes formas evolutivas de seu ciclo, como ovos, larvas e adultos em análise

microscópica de amostras fecais (RIBEIRO; FURST, 2012). Várias técnicas são utilizadas como a de Baermann (1917) adaptado por Moraes (1948), Rugai et al., (1954), a de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) (1934) ou sedimentação espontânea, sendo Baermann-Moraes e Rugai et al., os mais apropriados para evidenciar presença das larvas rabditóides e filarióides em amostras de fezes e solo. Ambos os métodos baseiam no hidrotropismo e no termotropismo das larvas. O número de larvas eliminadas é baixo e a liberação é irregular tornando o método parasitológico pouco confiável, requerendo assim testes de repetidas amostras, em dias alternados (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; COSTA-CRUZ, 2016).

Os métodos de coprocultura mais utilizados são o Método de Loss (carvão vegetal), cultura em placa de ágar (fezes semeadas em ágar contendo extrato de carne, cloreto de sódio e peptona), Harada & Mori (papel de filtro em tubos) e Brumpt (papel de filtro em placa de Petri), sendo o da placa de ágar o mais sensível (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Em estudo realizado por Pocaterra et al., (2017), uma única cultura em placa de ágar modificada obteve sensibilidade de 93,2% enquanto o método de Baermann apresentou sensibilidade de 76,6%. No entanto, estes métodos necessitam de um período de incubação aproximado de 24 a 48 horas tornando o resultado demorado, além de representar risco biológico para quem executa estes exames no laboratório (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; COSTA-CRUZ, 2016).

Dentre os métodos imunológicos podem ser utilizados: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *immunoblotting*, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; COSTA-CRUZ, 2016). Entretanto, esses ensaios mostram sensibilidade e especificidade variáveis, dependendo da preparação do antígeno, dos isotipos das imunoglobulinas e das populações testadas (NORSYAHIDA et al., 2013).

O método mais utilizado em laboratórios de pesquisa é a reação de ELISA, no qual podem ser utilizando antígenos heterólogos compostos por extratos solúveis de larvas filarióides de *Strongyloides ratti*, *Strongyloides cebus* ou *Strongyloides venezuelensis* para detecção de anticorpos séricos anti-*S. stercoralis* (COSTA-CRUZ, 2016). Porém, o método pode apresentar resultados falsos negativos, em infecções agudas, pois o sistema imunológico necessita de 4 a 6 semanas para desenvolver resposta imune específica ao parasito. Além disso, pode ocorrer a reatividade cruzada principalmente em pacientes infectados com filariose (MEJIA; NUTMAN, 2012) e ancilostomatídeos (HALL et al., 1994). O método torna-se importante para identificar casos de infecções latentes de estrogiloidíase, em pacientes de risco e/ou antes do início da administração quimioterápica (RIGO et al., 2008).

Em um estudo conduzido por Ramanathan et al., (2008) a técnica *luciferase immunoprecipitation systems* (LIPS) combinada com um antígeno recombinante (NIE)

demonstrou sensibilidade e especificidade de 100%. No entanto, o LIPS-NIE é uma técnica inovadora que não está disponível na maioria dos laboratórios, e o uso dessa metodologia ainda precisa ser melhor analisada sobre a identificação e discriminação de casos agudos crônicos e / ou tratados. Além disso, esse método precisa ser melhor estudado principalmente em pacientes imunossuprimidos (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

O sorodiagnóstico é um avanço importante nesta parasitose, principalmente para indivíduos imunossuprimidos, onde esta doença pode diminuir a qualidade e a sobrevivência desses pacientes (GONÇALVES et al., 2012; CUNHA et al., 2017). A detecção de imunocomplexos em amostras de soro pode ser uma estratégia para o diagnóstico da estrogiloidíase ativa demonstrando que os complexos antígeno e anticorpo podem servir como marcadores para a doença ativa (GONÇALVES et al., 2012; GONÇALVES et al., 2016).

Diretrizes da Sociedade de doenças infecciosas da América, da sociedade americana de transplantes, dos centros de controle e prevenção de doenças e da sociedade americana de transplante de sangue e medula óssea recomendam o teste ELISA para detecção de IgG anti-*Strongyloides* para pacientes de áreas endêmicas com eosinofilia e sintomas gastrointestinais proeminentes, antes do transplante de órgão sólido ou de células-tronco hematopoiéticas (NORSYAHIDA et al., 2013).

Outro método que pode ser utilizado é o diagnóstico molecular como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real, que se baseia na detecção de DNA de *S. stercoralis* em amostras fecais (VERWEIJ et al., 2009). Os métodos moleculares como PCR e suas variáveis são altamente sensíveis e específicos para detectar DNA do parasito em amostras de fezes humanas podendo ser utilizados como ferramentas alternativas para a detecção de *S. stercoralis* principalmente em áreas tropicais (SITTA et al., 2014; PAULA et al., 2015). Embora a técnica de PCR seja altamente específica, ela ainda não deve ser recomendada como diagnóstico universal, nem qualquer outro método isolado para o diagnóstico individual da infecção por *S. stercoralis*. No entanto, a PCR pode ser utilizado na confirmação da infecção (BUONFRATE et al., 2018).

1.7 – Tratamento

Ivermectina, tiabendazol e albendazol são os medicamentos mais eficazes para o tratamento da estrogiloidíase (WHO, 2018). Em indivíduos imunocompetentes deve se administrar por via oral nas doses de 400 mg de albendazol duas vezes ao dia por 7 dias, 25

mg/kg de tiabendazol a cada 12 h por 3 dias ou 200 µg/kg ivermectina uma vez ao dia, por 2 dias (JOURDAN et al., 2018). A ivermectina é a droga de escolha, mas não está disponível em todos os países endêmicos (WHO, 2018).

Opções adicionais podem ser aprovadas para tratamento incluindo combinação de benzimidazóis e ivermectina. As contraindicações relativas podem ser levadas em consideração como reações adversas a medicamentos, primeiro trimestre de gestação, lactantes, idade inferior a um ano, terapia com anticonvulsivantes (para albendazol e mebendazol) e coinfeção por *Loa loa*, no qual, o tratamento com ivermectina pode ser fatal (JOURDAN et al., 2018).

A síndrome de hiperinfecção deve ser considerada emergência médica potencial. O tratamento nesses casos deve ser iniciado imediatamente se esse diagnóstico estiver sendo considerado. Embora não tenham sido realizados ensaios controlados na síndrome de hiperinfecção, a ivermectina diária tem sido utilizada por no mínimo duas semanas. A avaliação de redução da terapia imunossupressora também deve ser uma parte importante do tratamento. (NUTMAN, 2017). Nos casos de hiperinfecção a ivermectina parenteral pode ser utilizada avaliando caso a caso (JOURDAN et al., 2018).

Para pacientes que serão transplantados, a terapia empírica principalmente em áreas de endêmicas deve ser considerada, mesmo se os resultados da avaliação diagnóstica forem negativos, uma vez que os testes laboratoriais disponíveis não são suficientemente sensíveis e específicos (ROXBY; GOTTLIEB; LIMAYE, 2009).

1.8 – *Phage display*

Epítomos de diversas proteínas antigênicas, constituintes de vários agentes causadores de doenças têm sido identificados pela tecnologia de exposição de biomoléculas em bacteriófagos utilizando a técnica de *phage display* (BAKSHINEJAD et al., 2016). Desde sua primeira descrição em 1985 por Smith, a técnica é amplamente utilizada para a seleção de peptídeos para diversas aplicações (PASCHKE, 2006). Dentre suas aplicações está a pesquisa de peptídeos, proteínas e anticorpos frente a vários alvos determinados alvos incluindo materiais inorgânicos, orgânicos e biológicos tais como, moléculas pequenas, polímeros naturais, nanoestruturas, células, bactérias e tecidos (TAN et al., 2016).

O princípio da tecnologia é utilizar uma biblioteca de fagos expressando grande diversidade de peptídeos para selecionar aqueles que se ligam ao alvo desejado. O fago filamentosso M13 é o vetor mais utilizado para construir bibliotecas aleatórias de apresentação de peptídeos (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010) e em contraste com outros fagos, o fago M13 consegue se replicar sem lisar a célula hospedeira (PASCHKE, 2006). Os fagos M13

possuem DNA de fita simples em formato circular e cinco proteínas de revestimento (PIII, PVI, PVII, PVIII e PIX). O ciclo de vida viral do fago M13 envolve uma infecção crônica não lítica, embora M13 possa infectar hospedeiros bacterianos sem os matar, é observada uma diminuição na taxa de crescimento nas células infectadas (TAN et al., 2016).

O fago filamentososo é uma partícula viral altamente versátil. Sua alta imunogenicidade e a capacidade de exibir vários antígenos de superfície tornam o fago uma excelente ferramenta devido a facilidade de manipulação genética (HENRY; ARBABI-GHAHROUDI; SCOTT, 2015). A tecnologia envolve a introdução de sequências peptídicas exógenas numa localização no genoma das proteínas da capsídeo do fago. Os peptídeos codificados são expressos na superfície do fago como um produto de fusão com uma das proteínas de revestimento do fago. Desta forma, é possível criar geneticamente diferentes proteínas ou peptídeos de uma só vez e expressar, purificar e analisar cada variante (ARAP, 2005). O *phage display* é uma poderosa ferramenta com características simples e alta eficiência para gerar ligantes específicos à uma vasta opção de alvos (TAN et al., 2016).

A seleção utilizada no *Phage display*, no qual, os peptídeos que se ligam a alvos específicos podem ser identificados por seleção de afinidade que é denominada *biopanning* (WU et al., 2016). O *biopanning* envolve cinco etapas principais: a primeira etapa é a preparação de uma biblioteca primária ou de uma biblioteca existente (podendo ser comercial), a segunda é a exposição dos fagos a um alvo específico, a terceira é a remoção de ligantes não específicos (lavagem), a quarta é a recuperação do fago ligante por eluição e amplificação do fago recuperado e a quinta etapa é a volta a primeira etapa, podendo repetir entre duas a quatro vezes (ARAP, 2005). Os fagos selecionados frente seus ligantes específicos podem ser aplicados na terapêutica, diagnóstico e biossensores (TAN et al., 2016). Após a seleção, estes peptídeos podem ser sintetizados e validados quanto a sua eficácia, e logo assim, podendo ser produzidos em escalas variadas.

1.9 - Modelos animais no estudo da estrogiloidíase

As espécies *S. venezuelensis* e *S. ratti*, parasitos de roedores são espécies utilizadas para estudar a relação parasito/hospedeiro em animais infectados pelo helminto (MARRA et al., 2011) sendo que a espécie *S. venezuelensis* é a mais utilizada pela semelhança do ciclo biológico de *S. stercoralis*. No qual, as larvas de *S. venezuelensis* penetram por via cutânea, migram para

os pulmões e depois são deglutidas e se instalam na mucosa do intestino (SATO; TOMA, 1990; FERREIRA et al., 2010).

Os antígenos obtidos de *S. venezuelensis* possuem determinantes antigênicos que apresentam reação cruzada com os antígenos de *S. stercoralis*, o que permite utilizá-los para diagnosticar a estrogiloidíase humana. Vários ensaios imunodiagnósticos têm sido estudados para detectar anticorpos contra *S. stercoralis*, porém têm-se mostrado ineficientes na detecção de infecções disseminadas, além de apresentarem reatividade cruzada com outros helmintos (COSTA-CRUZ, 2016). Entretanto, são importantes para detectar casos de infecções latentes de *S. stercoralis*, antes do início da administração quimioterápica ou em pacientes de risco (PACHECO-TENZA et al., 2018).

A utilização de larvas filarioides de *S. venezuelensis* é uma alternativa de obtenção de antígenos heterólogos utilizados para o diagnóstico de estrogiloidíase humana. Além disso, esta espécie é de fácil obtenção e manutenção em laboratório, apresenta bom rendimento larval em culturas de fezes utilizando-se carvão, além de eliminar o risco de infecção durante a manipulação (MACHADO et al., 2003). Os antígenos obtidos podem ser utilizados no diagnóstico da estrogiloidíase (GONÇALVES et al., 2012), mas podem funcionar também como precursores no desenvolvimento de vacina contra a estrogiloidíase (LEVENHAGEN; CONTE; COSTA-CRUZ, 2016).

1.10 - Desenvolvimento de vacinas

O desenvolvimento de vacinas depende dos modelos apropriados. A maioria dos helmintos parasitos é altamente adaptado ao seu hospedeiro definitivo, mas caso seja uma espécie hospedeira natural pode não ter sucesso na infecção. Particularmente este é o caso dos nematoides intestinais, pois os animais utilizados em laboratório não são suscetíveis à espécie infecciosa humana. Neste caso, é geralmente preferível estudar um parasito não humano relacionado no seu hospedeiro natural, para compreender os fatores e mecanismos que contribuem para a imunidade induzida pela vacina aos helmintos no trato gastrointestinal (HEWITSON; MAIZELS, 2014).

A tecnologia de *phage display* tem sido uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de vacinas baseadas em fagos. A capacidade de produzir bibliotecas combinatórias de peptídeos com um conjunto altamente diversificado de ligantes aleatórios transformou o *phage display* numa metodologia de rastreio simples, versátil e de elevado

rendimento para a identificação de potenciais vacinas candidatas contra diferentes doenças. Estas bibliotecas podem ser analisadas por meio de uma estratégia chamada *biopanning* contra uma ampla variedade de alvos para a seleção de mimotopos com alta antigenicidade e imunogenicidade (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016). Após a seleção dos mimotopos, as vacinas podem ser validadas *in vitro* e *in vivo*, com base em cultura de células e modelos animais, para demonstrar seu potencial imunogênico para formulações vacinais finais com um adjuvante apropriado (GOULART; SANTOS, 2016).

A vacinação contra parasitos é um desafio devido a seus ciclos de vida complexos de múltiplos estágios e longa vida envolvendo vários hospedeiros, levando muitas vezes a infecções crônicas e as vezes até à morte (GOULART; RIBEIRO; COSTA-CRUZ, 2017). Apesar da disponibilidade de medicamentos eficazes contra os parasitos causadores das helmintíases existem várias limitações nos programas de tratamento (McWILLIAM et al., 2012) como por exemplo, a perda da eficácia das drogas anti-helmínticas atuais devido ao aumento da resistência as drogas (NOON; AROIAN, 2017). As vacinas humanas mais estudadas são contra esquistossomose e ancilostomíase, onde as mesmas já estão sendo desenvolvidas para uso clínico (HEWITSON; MAIZELS, 2014). Nesta perspectiva, a utilização de peptídeos selecionados por *phage display* poderá servir na elaboração de vacinas visando à prevenção da estrogiloidíase.

A utilização da técnica de *phage display* tem sido muito eficiente no diagnóstico da estrogiloidíase humana. Cinco peptídeos fusionados em bacteriófagos (B2, B4, C9, C10 e D3) foram selecionados por *phage display* para detecção de IgG em pacientes com estrogiloidíase sendo que C9 e C10 foram os mais eficientes no diagnóstico desta parasitose (FELICIANO et al., 2014). A partir dos 3 clones que apresentaram melhor eficiência diagnóstica, ou seja, os mimotopos C9, C10 e D3. A síntese química foi realizada pela empresa Peptide 2.0 (www.peptide2.com). A massa molecular e a pureza dos peptídeos C9, C10 e D3 foram respectivamente 2231,48 e 90,31%; 2377,67 e 92,97%; 2141,48 e 95,01%. Cada peptídeo sintético foi constituído por dois mimotopos com a inserção de uma sequência espaçadora (GGGS) entre os peptídeos conformacionais de sete aminoácidos, sendo na extremidade N-terminal acoplado ao BSA e a outra região carboxi-terminal foi realizada amidação (FELICIANO et al., 2016).

Uma das grandes dificuldades no imunodiagnóstico da estrogiloidíase está principalmente na detecção precoce da infecção principalmente em paciente imunossuprimidos. A detecção de pacientes assintomáticos também é de grande importância, pois, uma vez diagnosticados e tratados estes indivíduos podem interromper o ciclo biológico do parasito.

Além disso a reatividade cruzada com outras parasitoses é uma das grandes dificuldades do imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Desta forma, a utilização de peptídeos ligantes ao peptídeo C10 obtidos por *Phage display* pode ser uma estratégia interessante para detectar imunocomplexos em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase.

2 – OBJETIVOS

Diante de trabalho anteriormente realizado pela equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses e do Laboratório de Nanobiotecnologia foram selecionados cinco peptídeos (B2, B4, C9, C10 e D3) que se apresentaram eficientes para o diagnóstico da estrogiloidíase humana (FELICIANO et al., 2014; FELICIANO et al., 2016).

Parte 1 – Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10

2.1 – Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi utilizar a tecnologia de *phage display* para selecionar peptídeos que se liguem ao peptídeo sintético C10 e a aplicação desses ligantes na detecção de antígenos de *Strongyloides* sp. e imunocomplexos em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase humana.

2.1.1 – Objetivos específicos

- Realizar *biopanning* contra o peptídeo sintético C10.
- Caracterizar os peptídeos expressos em fagos mais reativos, utilizando o sequenciamento e bioinformática.
- Avaliar o potencial no reconhecimento antigênico de *S. venezuelensis*.
- Avaliar o potencial diagnóstico dos clones de fagos selecionados na detecção de imunocomplexos em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase.

Parte 2 – Potencial vacinal

2.2 – Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi verificar a utilização de peptídeos miméticos de antígenos de *S. venezuelensis* em formulação vacinal no controle da estrogiloidíase experimental.

2.2.1– Objetivos específicos

- Imunizar os animais com fagos M13 expressando os peptídeos C9 e C10 e com fagos M13 selvagens.
- Inocular larvas L3 de *S. venezuelensis* nos animais, após a imunização para verificar o potencial protetor do peptídeo testado.
- Realizar contagem global e diferencial de leucócitos.
- Quantificar carga parasitária por contagem de ovos por gramas de fezes.
- Verificar o título de anticorpos IgG por ELISA.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Parte 1 - Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10

3.1.1 - Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos (CEP) da UFU (nº 553/2009). Realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas e no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa-Cruz e coordenação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

As amostras de soro utilizadas foram obtidas do banco de amostras biológicas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFU) número 041/2008.

A cepa de *S. venezuelensis* utilizada é mantida em ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) no Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais/UFU (CEUA/UFU) - protocolo de Nº 075/2008.

A cepa de *Taenia crassiceps* é mantida em camundongos fêmeas *Mus musculus* (linhagem BALB/c) no Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais/UFU (CEUA/UFU) - protocolo de Nº 182/2014.

3.1.2 - Amostras de soro

Todos os sujeitos foram submetidos ao exame parasitológico das fezes. Pelo menos três amostras fecais foram analisadas pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e pelo método de Lutz (1919). Foram utilizadas 120 amostras de soro distribuídas em 3 grupos:

Grupo 1 = 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico de fezes positivas para *S. stercoralis*.

Grupo 2 = 40 amostras de soro de indivíduos sem infecção parasitológica confirmada por exame parasitológico de fezes.

Grupo 3 = 40 amostras de soro de pacientes infectados com outros parasitos: *Ascaris lumbricoides* (n=5), ancilostomídeos (n=5), *Entamoeba histolytica/díspar* (n=4), *Enterobius*

vermicularis (n=5), *Hymenolepis nana* (n=3), *Giardia lamblia* (n=5), *Schistosoma mansoni* (n=4), *Taenia* sp. (n=8) e *Trichuris trichiura* (n=1).

3.1.3 – Phage display

Para o *phage display* foi utilizado um kit de bibliotecas randômica de peptídeos de fagos Ph.D.TM (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA). A biblioteca Ph.D.-12 é uma biblioteca combinatória de peptídeos com 12 aminoácidos aleatórios fusionados a pIII do fago M13KE.

O procedimento de *biopanning* foi realizado conforme descrito por Barbas et al., (2001) e Goulart e Santos (2016) com algumas modificações. No *biopanning* foram realizadas quatro seleções: duas negativas e duas positivas (Figura 3). A seleção negativa foi realizada utilizando a albumina de soro bovino (BSA) e a seleção positiva foi realizada com o peptídeo sintético C10 (Figura 3). Uma placa de poliestireno de alta afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foi sensibilizada com 1 µg/poço de BSA (2 poços) e com o peptídeo C10 1 µg/poço (2 poços) ambos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) e incubado *overnight* a 4 °C e mantidos em câmara úmida (Figura 3). No dia seguinte, os poços foram bloqueados com *phosphate-buffered saline* (PBS) (0,1 mol/L, pH 7,2), Tween 20 a 0,05% e 5% de BSA (PBST-BSA) durante 1 h a 37 °C. Depois, foi lavado cinco vezes com PBST.

Na seleção negativa foi adicionado 10 µL da biblioteca randômica de fagos (1.10¹¹) diluídos em PBS-T ao poço com BSA e incubado durante 30 min a 37 °C, o sobrenadante foi recolhido e repassado ao segundo poço com BSA e incubados nas mesmas condições (Figura 3). Na seleção positiva o sobrenadante obtido do segundo poço com BSA foi transferido para o poço sensibilizado com o peptídeo sintético C10 e incubado durante 30 min a 37 °C, logo após o sobrenadante foi coletado e repassado para o segundo poço com o peptídeo C10 e incubado nas mesmas condições (Figura 3). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os dois poços foram lavados 10 vezes com PBS-T. Para desfazer a ligação dos fagos com o peptídeo C10 foi realizado eluição ácida com glicina (pH 2,2) durante 10 min à temperatura ambiente (TA). Depois, o sobrenadante (eluato) foi coletado e transferido para microtubos e realizado a neutralização com Tris (pH 9,1). O eluato foi armazenado a 4 °C até os passos de amplificação e titulação.

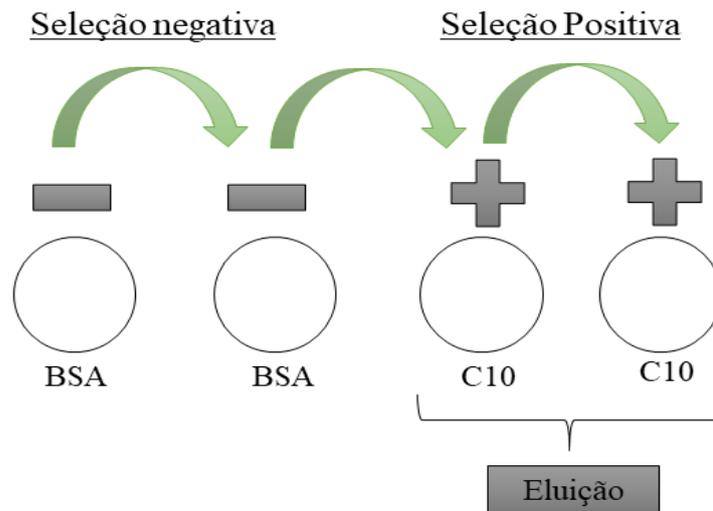


Figura 3 - Estratégia de *biopanning* para a seleção de clones de peptídeos expressos em fagos ligantes ao peptídeo sintético C10. Seleção negativa foi realizada com soro albumina bovina (BSA) e a seleção positiva com o peptídeo C10.

Após a primeira seleção, os fagos ligantes ao peptídeo sintético C10 foram amplificados. Para amplificação, foi preparado 20 mL (para cada clone de fago) de meio Luria Bertani (LB), acrescentado de tetraciclina (1/1) e adicionado uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação em *shaker* (250 rpm) a 37 °C até a fase *early-log* (densidade óptica-DO 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 190 µL do eluato obtido na etapa anterior e incubados sob agitação em *shaker* (200 rpm) a 37 °C *overnight*. No dia seguinte todo o meio foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo e adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl e incubados *overnitgh* a 4 °C. No outro dia, foi centrifugado durante 15 min a 10.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Em seguida foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl e incubado em gelo durante 1 h. Então foi realizada centrifugação por 10 min a 14.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 200 µl de PBS. Este eluato amplificado resultante do primeiro ciclo de seleção foi utilizado como entrada em subseqüentemente por 3 ciclos de seleção.

3.1.4 – Titulações dos fagos

O procedimento de titulação foi realizado conforme descrito por Barbas et al., (2001) e Goulart e Santos (2016) com algumas modificações. A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos de *biopanning*. A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Foram realizados três ciclos e a titulação foi realizada no início e no final de cada ciclo. No início de cada ciclo denominados eluato amplificados (EA) foram utilizadas as diluições de 10^{-8} a 10^{-11} e no final de cada ciclo ou eluato não amplificados (ENA) foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} . Para cada placa foi adicionado 1 μ L de cada eluato nas diluições indicadas mais 200 μ L da cultura de ER2738 na fase *early log* ($OD_{600} \sim 0,5$) e incubados por cinco min. As soluções contendo as diluições de bactérias infectadas com os clones de fagos foram transferidas para tubos de 15 mL contendo três mL de Agarose Top (210 mg de agarose, 600 mg de LB, 30 mg $MgCl_2$) a 45°C. Logo após, foram espalhadas sobre placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/X-Gal e tetraciclina e incubadas à 37 °C por 16 h. Para cada diluição foi preparada uma placa de Petri (oito no total de cada *round*). A coloração azul das colônias confirmou a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β -galactosidase pelo fago. As colônias azuis contadas foram multiplicadas pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

3.1.5 – Amplificação e purificação dos clones de fagos

O procedimento de amplificação e purificação dos clones de fagos foi realizado conforme descrito por Barbas et al., (2001) e Goulart e Santos (2016) com algumas modificações. Para a amplificação dos clones selecionados, uma colônia de *E. coli* ER2738 foi inoculada em meio LB (com tetraciclina 1/1) e incubada sob agitação por 4 h a 37 °C. Desta cultura ($OD_{600} \sim 0,3$), foi distribuído 1,2 mL em cada poço da placa *deepwell*. A placa de Petri da titulação obtida do 3º ciclo de *biopanning* (3º não amplificado) foi utilizada nesta etapa. As bactérias infectadas com fagos (colônias azuis) foram retiradas da placa de Petri, com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e transferidas para um poço da placa *deepwell* contendo meio LB, totalizando 96 poços. A placa foi vedada com filme selador transparente para microplacas (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) e incubada, *overnight* sob agitação (250 rpm) a 37 °C. Após esse período foi realizado um *backup*, no qual 100 μ L de cada poço foram transferidos para uma placa de microtitulação (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), adicionado

100 µL de glicerol 50% e mantidas a -20 °C. A placa *deepwell* foi então centrifugada por 20 min a 3.700 rpm, transferindo seu sobrenadante para uma outra *deepwell*. Esta amplificação foi utilizada na pré-validação para selecionar os 10 clones mais prevalentes e para extração de DNA para sequenciamento.

3.1.6 – Pré-validação por *Phage-ELISA* dos clones selecionados

A pré-validação foi realizada para identificar os fagos mais prevalentes e estes foram selecionados para a extração do DNA de fagos ligantes ao peptídeo sintético C10. No total foram utilizados 96 clones da amplificação realizada no item anterior. As placas de poliestireno foram sensibilizadas com o peptídeo C10 na concentração de 1µg/poço, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M (pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com PBS-BSA a 5% por uma hora a 37 °C. Após, foram adicionadas 50 µl do sobrenadante de fago em cada poço e incubado por uma hora a 37 °C. Após foi adicionado o conjugado anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, Holanda) marcado com peroxidase na diluição 1/5000 em PBS-T e incubado por uma hora a 37 °C. Em cada uma das etapas foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). A reação foi revelada pela adição de 5 µg de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e 5 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em 12,5 mL de tampão fosfato-citrato (0,1 M pH 5,5). A reação prosseguiu por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foi interrompida pela adição de 25 µL/poço de H₂SO₄ a 2N (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O experimento foi realizado em duplicata e a densidade óptica (DO) foi obtida em leitora de microplacas (TP Reader, Thermo Plate, Brasil) a 492 nm. Os resultados foram todos expressos graficamente pela média das DO.

3.1.7 – Extração de DNA dos clones de fagos

Para a extração do DNA do fago, os 10 clones mais prevalentes na pré-validação foram identificados. Utilizando a mesma amplificação da etapa 3.1.4. Então, um mL do sobrenadante de fagos foi transferido para uma nova placa *deepwell*. Em seguida, 200 µL de PEG/NaCl foi adicionado e incubado por 10 min a T.A. Após, foi centrifugado por 10 min a 3.700 rpm a 20 °C e todo o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão de iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) e a placa foi agitada

vigorosamente. Em seguida foi adicionado 250 μ L de etanol absoluto e incubado por 10 min a T.A. Após a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 40 min, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 400 μ L de etanol a 70% e deixado por 10 min em T.A. Em seguida foi centrifugado por 40 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 μ L de água estéril.

3.1.8 – Sequenciamento de DNA dos fagos e dedução da sequência

A sequência de nucleotídeos do inserto do gene III foi sequenciada utilizando o kit *Genomelab DTCS Quick Start* (Beckman Coulter/Sciex, Fullerton, USA) de acordo com as instruções fabricante. Foram utilizados 500 ng de DNA molde, 5 pmol do primer-96 gIII (5' - OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - New England BioLabs Inc, Ipswich, EUA). A reação foi realizada em 30 ciclos no termociclador (*Master Cycler*, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) sob as seguintes condições: desnaturação (a 96 °C por 20 segundos), anelamento do *primer* a 50 °C por 20 segundos e extensão a 60 °C por 4 min. A leitura do sequenciamento foi realizada em um sistema de análise Genética GenomeLab GeXP (Beckman Coulter/Sciex, Fullerton, USA).

As sequências de aminoácidos foram deduzidas de acordo com as sequências de nucleotídeos e analisadas usando o software ExPASy Translate, disponível online (<http://web.expasy.org/translate/>). Os peptídeos identificados foram comparados quanto a homologia entre os mesmos pelo programa *Clustal Omega*, disponível online (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.1.9 – Seleção de fagos por ELISA

Placas de microtitulação de alta afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foram sensibilizadas com 1 μ g por poço dos peptídeos C10 ou BSA diluídos em tampão carbonato/bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) e incubados *overnight* a 4 °C em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com PBS-BSA a 5% durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, os fagos sequenciados (A7, A8, C2, C4, D1, F1 e G8) foram adicionados nas placas (1.10^{10}) o fago selvagem foi usado como controle na mesma concentração. Em seguida o anti-M13 marcado com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, Holanda) foi então adicionado 1/5000 diluído em PBS-T e incubado durante 1 h a 37 °C. Em cada passo foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A

reação foi revelada como no item 3.1.6. A DO foi obtida em leitora de microplacas (TP Reader, Thermo Plate, Brasil) a 492 nm e expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / DO \text{ do } cut \text{ off}$ (SILVA et al., 2002).

3.1.10 – Utilização de fagos na detecção de imunocomplexo por ELISA sanduíche

Para detecção de imunocomplexo (IC), foi realizado um ELISA sanduíche. Testes preliminares foram conduzidos para determinar as condições ótimas de fagos, soro e conjugado. Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foram revestidas com 50 μL /poço com os fagos C4 e G8 ($1,10^{11}$ UFC/poço) em solução tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4 °C. Amostras de soro (1/80) de pacientes com estrogiloidíase, outras parasitoses e sem detecção de formas parasitárias nas fezes (negativos), foram diluídas em PBST e incubadas durante 45 min a 37 °C. As placas foram incubadas com anti-IgG humana (Fc específica) conjugada com peroxidase (Sigma-AldrichCo., St. Louis, EUA) diluído (1/2000) em PBST, durante 45 min a 37. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes durante 5 min com PBST. A revelação e leitura da reação foram realizadas conforme descrito no item 3.1.6. Os dados foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / DO \text{ do } cut \text{ off}$ (SILVA et al., 2002).

3.1.11 - Ensaio ELISA de competição

O ELISA de competição foi utilizado para analisar as especificidades de ligação dos clones de fagos ao peptídeo C10. Microplacas de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foram sensibilizadas com 1 μg /poço do peptídeo sintético C10 diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubada *overnight* a 4 °C. A placa foi bloqueada com PBS-BSA a 5% e incubada por 60 min a 37 °C. Logo após, os fagos (C4 e G8) foram diluídos 1.10^{11} em PBS-T e adicionadas em diluições de soros de pool de pacientes com estrogiloidíase (40, 80, 120, 160, 200 e um poço sem soro) em microtubos, então 50 μL de cada foram transferidos para microplaca de poliestireno incubada a 37 °C por 2 h. Depois, o conjugado anti-M13 marcado com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roose-ndaal, Holanda) foi adicionado a (1/5000) diluído em PBS-T e incubado durante 1 h a 37 °C. Entre cada passo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. A reação

foi revelada pela adição de 5 µg de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e 30% de peróxido de hidrogênio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em tampão fosfato de citrato (0,1 M pH 5,5). A reação prosseguiu por 15 min e foi interrompida pela adição de 25 µL / poço 2 NH₂SO₄ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A DO foi determinada a 492 em uma leitora de microplacas (TP Reader, Thermo Plate, Brasil). Os resultados foram expressos como percentagem de inibição, em que: % de inibição = 1 - (OD inibido/OD não inibido) x 100 (AHMAD; MOINUDDIN, 2012).

3.1.12 - Obtenção das larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1947) foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem está sendo mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil.

As larvas filarioides utilizadas foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Para a coprocultura no 7º d.p.i. o mini-isolador foi trocado contendo maravalha nova e as fezes dos animais foram recolhidas no 9º d.p.i. As fezes coletadas foram homogeneizadas com carvão animal e mantidas em estufa por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2016), e foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brizola (1954).

3.1.13 - Extrato de salino de *S. venezuelensis*

Extrato salino total foi produzido de acordo com Gonzaga et al. (2011) com modificações. Aproximadamente 300.000 larvas infectantes de *S. venezuelensis* foram ressuspensas em 500 µL PBS (0,1 mol / L, pH 7,2) juntamente com 100 µL do coquetel de inibidores de proteases (cOplete ULTRA mini, Roche, Mannheim, Alemanha) para cada um mL do homogenato, rompidas por ciclos de congelamento (1 min, -196 ° C) e macerados com auxílio de Almofariz e pistilo. Foi realizado cinco ciclos de descongelamento e congelamento seguidos de maceração. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 12.400 × g por 30 min. a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido (extrato). A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al.,1951), e o extrato foi submetido a SDS-PAGE a 12% com (LAEMMLI, 1970) para caracterização do perfil protéico. O extrato salino total foi então armazenado a -20 ° C até ser utilizado.

3.1.14 - Ensaio ELISA indireto para reconhecimento antigênico

O ELISA indireto foi utilizado para analisar as especificidades de ligação dos clones ao antígeno de *S. venezuelensis*. Microplacas de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foram revestidas com 5 µg/mL do extrato salino de *S. venezuelensis* diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubada *overnight* a 4 °C. Logo após, os fagos C4, G8 e fagos selvagens foram diluídos (1.10^{11}) em PBS-TM e 50 µL de cada um foram transferidos para microplaca de poliestireno que foi incubada a 37 °C por 45 min. O restante da reação foi realizado conforme o item 3.1.10. Os dados foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / DO \text{ do cut off}$ (SILVA et al., 2002).

3.1.15 - Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A imunofluorescência indireta foi realizada com larvas infectantes de *S. venezuelensis* e formas metacestódeas de *Taenia crassiceps* (controle negativo). Os parasitos foram incorporados em Tissue-tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda) e foram congelados a -25 °C. Secções de dois micrômetros de espessura foram cortadas utilizando um criomicrotomo. Os cortes foram aderidos em lâminas foscas de microscopia. Trinta microlitros de fagos C4, G8 e selvagens (2.10^{12}) foram diluídos em PBS adicionados nas secções e incubados em câmara úmida a 37 °C por 1 h. Posteriormente, foi adicionado anti-M13 sem marcação produzido em camundongos (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) na diluição de 1/50 e incubados em câmara úmida a 37°C por 1h. Após, anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-AldrichCo., St. Louis, EUA) foi diluído (1/50) em azul de Evans 3% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e incubado a 37 °C por 1 h. As amostras foram lavadas três vezes com PBS entre cada passo. As lâminas foram montadas usando glicerol/PBS (pH 9,0) e lamínulas. O perfil de coloração dos cortes e imagens foram obtidos utilizando microscópio confocal LSM 510 (Leica CM 1850 UV, Wetzlar, Alemanha).

3.1.16 – Normas de Biossegurança

O procedimento de coleta e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.1.17 – Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Todos os dados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$.

Na detecção de imunocomplexo por ELISA foi realizada a análise usando o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para comparações entre grupos. Os parâmetros diagnósticos área sob curva (AUC), sensibilidade (Se), especificidade (Sp) foram obtidos por *receiver-operating characteristic* (ROC). Também foram calculados valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), acurácia (acc) e índice de Youden (J) (SOPELETE, 2009).

Parte 2 - Potencial vacinal

3.2.1 - Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa Cruz e no laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da UFU sob coorientação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart. O estudo foi realizado sob o protocolo de aprovação 145/17 do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU.

A cepa de *S. venezuelensis* utilizada para a infecção desafio e produção de extrato salino total é mantida em ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) no Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais/UFU (CEUA/UFU) - protocolo de N° 075/2008.

3.2.2 – Animais

Os animais utilizados no experimento foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) - UFU, sendo considerados *Specific Pathogen Free* (SPF). Foram acondicionados em mini-isoladores (ventilife, Alesco, Monte Mor, Brasil) com densidade máxima de 6 animais alojados em um rack ventilado *Individually Ventilated Caging* (IVC) (ventilife, Alesco, Monte Mor, Brasil) de alta biocontenção, com temperatura, ventilação e pressão controladas. Os animais foram mantidos em cama de maravalha (“serragem”) com

água filtrada e alimentados com ração industrial Nuvital *ad libitum*. Todas as trocas e procedimentos foram realizadas em um fluxo laminar (BioSafety cabinet Tecniplast®, Varese, Itália). O CBEA possui controle de aquecimento e refrigeração, mantendo sempre a temperatura entre 22 ± 2 °C e iluminação artificial constituindo em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acessas das 7:00 às 19:00 horas).

Para os experimentos foram utilizados 72 ratos da espécie *Rattus norvegicus* (*Wistar*) machos de 4 a 6 semanas de idade (100 a 180g) divididos aleatoriamente em 12 grupos, com seis indivíduos em cada:

Grupo 1: animais sem infecção – controles negativos (*Naïve*).

Grupo 2: animais inoculados com PBS e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* – controles positivos.

Grupo 3: animais imunizados com fagos expressando peptídeo C9 juntamente com hidróxido de alumínio e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 4: animais imunizados com fagos expressando peptídeo C9 juntamente com saponina e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 5: animais imunizados com fagos expressando peptídeo C10 juntamente com hidróxido de alumínio e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 6: animais imunizados com fagos expressando peptídeo C10 juntamente com saponina e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 7: animais imunizados com fagos expressando os peptídeos C9 e C10 juntamente com hidróxido de alumínio e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 8: animais imunizados com fagos expressando os peptídeos C9 e C10 juntamente com saponina e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 9: animais imunizados com fagos selvagens juntamente com hidróxido de alumínio e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 10: animais imunizados com fagos selvagens juntamente com saponina e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 11: animais imunizados com hidróxido de alumínio e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

Grupo 12: animais imunizados com saponina e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

3.2.3 – Amplificação e purificação dos fagos

Anteriormente foram selecionados por *Phage display* peptídeos miméticos a *Strongyloides stercoralis* ligantes a imunoglobulinas G de pacientes com estrogiloidíase. Após seleção dos peptídeos ligantes, o DNA dos clones selecionados foi extraído, sequenciado e analisado (FELICIANO et al., 2014). Desta forma dois destes fagos expressando os peptídeos foram selecionados (Tabela 1) para realização da imunização *in vivo* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

Tabela 1 - Caracterização dos peptídeos selecionados para imunização demonstrando a sequência e tamanho dos peptídeos.

Clones selecionados	Sequência de aminoácidos	Tamanho
C9	--AP ^{verde} SF ^{verde} FH ^{verde} S	7aa
C10	S ^{verde} R ^{verde} T ^{verde} P ^{verde} S ^{verde} A ^{verde} T ^{verde} --	7aa

Representação dos aminoácidos: verde = polares, vermelho = hidrofóbicos, azul = ácidos.
aa: aminoácidos.

O procedimento de amplificação e purificação foi realizado conforme descrito por Barbas et al., (2001) e Goulart e Santos (2016). Para amplificação, foi preparado 20 mL (para cada clone de fago) de meio Luria Bertani (LB), acrescentado tetraciclina (1/1) e adicionado uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação em *shaker* (200 rpm) a 37 °C até a fase *early-log* (densidade óptica-DO 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 10 µL dos fagos selvagens e fagos expressando os peptídeos C9 e C10 (isoladamente) e incubados sob agitação em *shaker* (200 rpm) a 37 °C *overnight*. No dia seguinte todo o meio foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi recolhido, transferido para outro tubo, adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl e incubados *overnitgh* a 4 °C. No dia seguinte, foi centrifugado durante 15 min a 10.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspense em 1 mL de PBS. Após, foi transferido para novos microtubos, adicionado 1/6 PEG/NaCl e incubado em gelo durante 1 h. Em seguida foi realizada centrifugação de 10 min a 14.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspense em 200 µl de PBS e quantificado em espectrofotômetro. Para a quantificação foi utilizado 10 µL do sobrenadante de cada um dos fagos amplificados e adicionado 990 µL de PBS 1X (estéril), foi utilizado também 1 mL de PBS 1X (estéril) como controle (*blank*).

3.2.4 – Obtenção das larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1947) foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem está sendo mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil.

As larvas filarioides utilizadas foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Para a coprocultura no 7º d.p.i. o mini-isolador foi trocado contendo maravalha nova e as fezes dos animais foram recolhidas no 9º d.p.i. As fezes coletadas foram homogeneizadas com carvão animal e mantidas em estufa por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2016), e foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brizola (1954).

3.2.5 - Imunização dos animais e infecção desafio

Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias cada, seguidas de uma infecção desafio com larvas infectantes de *S. venezuelensis* (15 dias após a última imunização). Para imunização dos animais foram utilizados os clones C9 e C10, anteriormente selecionado por *phage display* mediante anticorpos IgG de pacientes com estrogiloidíase humana (FELICIANO et al., 2014) e bacteriófagos M13 selvagens.

Os animais do grupo 1 e 2 receberam 300 µL de PBS estéril. Os animais do grupo 3, 5, 7 e 9 foram imunizados com 1.10^{12} (*plaque-forming unit*-PFU/animal) juntamente com ALHYDROGEL® adjuvante em gel hidróxido de alumínio (InvivoGen, San Diego, EUA) na concentração indicada pelo fabricante (1/1). Os animais do grupo 4, 6, 8 e 10 foram imunizados com 1.10^{12} PFU/animal juntamente com 10 µg de Saponina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Os ratos receberam as formulações com um volume final de 300 µL via subcutânea e foram realizadas duas imunizações com período de 15 dias cada.

Após 15 dias da última imunização os ratos foram inoculados por via subcutânea com 3.000 larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Os animais do grupo 11 e 12 foram inoculados

apenas com adjuvante e PBS constituindo um volume final de 300 μ L e realizado a infecção nas mesmas condições que os outros grupos (Figura 4).

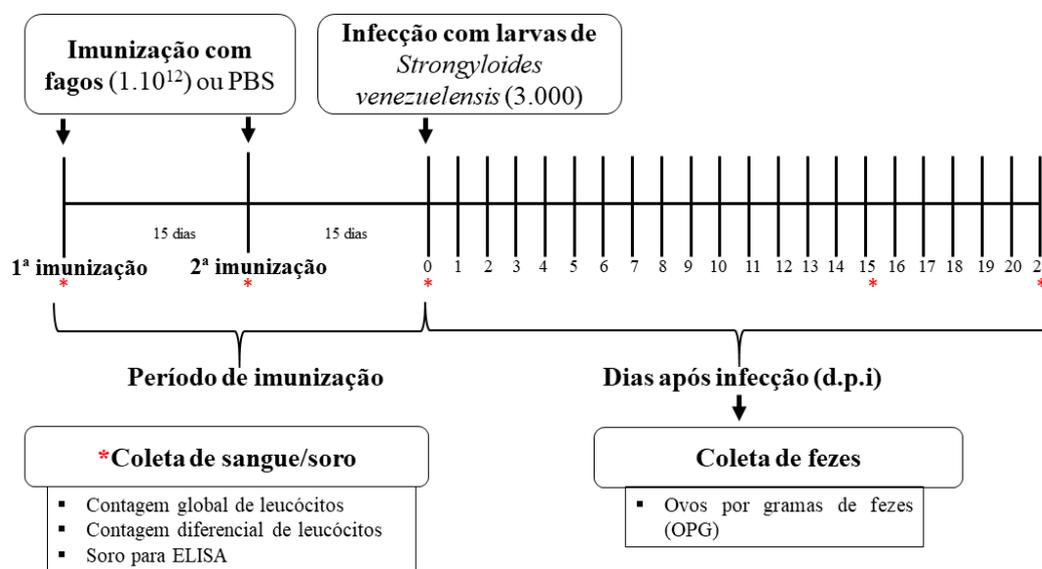


Figura 4 - Delineamento experimental da imunização e infecção desafio.

Nos dias 0, 15 e 30 do período de imunização e nos 15 e 21 após infecção foram coletados sangue para contagem global e diferencial de leucócitos e obtenção do soro para acompanhamento da produção dos níveis de anticorpos. As fezes dos ratos foram recolhidas diariamente por 21 dias para contagem de ovos por gramas de fezes.

Aos 21 dias de infecção todos os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésicos (60 mg/kg cetamina associado a 10 mg/kg xilazina), administrado via intraperitoneal.

3.2.6 – Pesagem dos ratos

Todos os ratos de todos os grupos foram pesados nos dias 0, 15 e 30 do período de imunização e nos 15 e 21 dias após infecção.

3.2.7 - Contagem global e diferencial de leucócitos

Os parâmetros hematológicos analisados foram: leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Nos dias 0, 15 e 30 do período de imunização e

nos 15 e 21 após infecção foram coletados aproximadamente 250 µL sangue dos animais. O sangue foi coletado em microtubos com EDTA K2 (Vacuplast Carl, Cotia, Brasil). Para contagem global 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de solução de Turk (Renylab, Barbacena, Brasil). A contagem foi feita em câmara de Neubauer em microscópio óptico (FACCIOLI et al., 1998).

A contagem diferencial foi realizada em extensões de sangue (esfregaços sanguíneos) e corado por kit Panótico (Laborclin, Pinhais, Brasil), sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x segundo Faccioli et al., (1998). O restante de cada amostra de sangue coletada foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min e o soro foi coletado e armazenado a -20 °C.

3.2.8 – Contagem de ovos por grama de fezes

Durante todos os procedimentos experimentais, os ratos foram mantidos nos mini-isoladores sendo acondicionados seis animais por grupo experimental. Após a infecção parasitária, as fezes foram coletadas diariamente até 21 dias após infecção (d.p.i). As amostras foram processadas individualmente usando a técnica de Cornell-McMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939) com sensibilidade de 50 ovos por grama de fezes (OPG) (BOWMAN, 2014). A câmara de McMaster com dois lados (A e B) foi usada, e o número de ovos de *S. venezuelensis* foi contado dentro da grade de cada lado câmara. Para cada grupo uma grama de fezes frescas foi pesada e diluída em 15 mL de solução saturada de NaCl a 30% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), filtrado e colocado na câmara de McMaster e realizada a leitura após 10 min. Como não foi possível individualizar os animais foram realizadas seis repetições de cada grupo (seis repetições diariamente por mini-isolador). Os ovos por grama de fezes foram calculados pela soma dos ovos nos lados A e B da câmara de McMaster e multiplicados por 50 (GORDON; WHITLOCK, 1939).

3.2.9 - ELISA indireto para verificação dos títulos de anticorpos IgG

Para acompanhar a produção de anticorpos específicos contra *S. venezuelensis* foi realizado ELISA indireto (SOUSA et al., 2016) com algumas modificações. As placas de poliestireno com fundo plano de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Solingen, Alemanha) foram revestidas com 50 µL do extrato salino de *S. venezuelensis* na concentração de 5 µg/mL, diluído em tampão

carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubada *overnight* a 4°C em câmara úmida. *Pool* das amostras de soros (1/10) foram diluídas em PBS (0,1 mol / L, pH 7,2) Tween 20 a 0,05% e leite desnatado (Molico, Nestle, Brasil) 1% (PBSTM) e foram adicionadas às placas e incubadas a 37 °C durante 45 min. Após incubação foi adicionado 50 µL do conjugado com peroxidase, anti-IgG de rato (molécula completa, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), diluído (1/2000) em PBST. Após cada incubação, as placas foram lavadas 3 vezes por 5 min com PBST. A reação foi revelada pela adição de 5 µg de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e 5 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em 12,5 mL de tampão fosfato de citrato (0,1 M pH 5,5). A reação prosseguiu por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foi interrompida pela adição de 25 µL poço de H₂SO₄ a 2N (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (TP Reader, Thermo Plate, Brasil). O *cut off* de cada reação foi determinado pela média dos valores de DO das amostras de soros coletados antes de iniciar os experimentos (soros pré-*imunes*). Os níveis de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: IE = DO da amostra / DO do *cut off* (SILVA et al., 2002).

3.2.10 – Normas de Biossegurança

O procedimento de coleta e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.2.11 – Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Todos os dados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$.

O número de ovos por grama de fezes (OPG) foi expresso como média ± erro padrão da média. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste U de Mann Whitney seguido do pós-teste de Bonferroni. Também foi realizado o cálculo de porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) de acordo Coles et al., (1992) com adaptações utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de redução} = 1 - \frac{\text{média grupo não imunizado}}{\text{média do grupo imunizado}} \times 100$$

4 – RESULTADOS

Parte 1 - Seleção de ligantes ao peptídeo sintético C10

4.1. - *Biopanning*

Para a realização do *biopanning*, foi utilizado o peptídeo sintético C10 (seleção positiva) ou BSA (seleção negativa), o peptídeo C9 não foi utilizado, pois o mesmo, após a fabricação não diluiu inviabilizando-o para os ensaios. Para a seleção dos fagos foi utilizada uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-12aa New England BioLabs Inc, Ipswich, EUA), totalizando 3 ciclos de seleção. Para cada seleção foram realizadas as titulações para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*.

As titulações foram eficientes em todos os ciclos de seleção de fagos, visto que as colônias de bactérias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos, como consequência do processo de infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) (Figura 5).

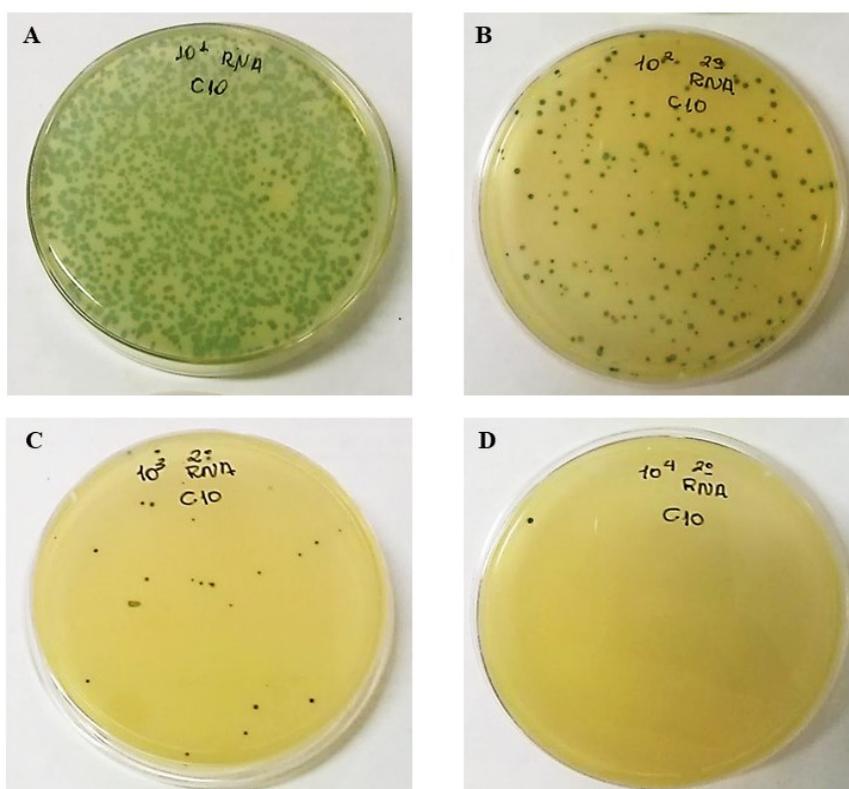


Figura 5 – Exemplo da titulação dos fagos obtidos nos *rounds* de seleção. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) pelos fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase. A, B, C e D representam as titulações 10^{-1} a 10^{-4} , respectivamente.

A solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob \log^{10} em meio LB. Os títulos de entrada fagos (eluato amplificado) e saída fagos (eluato não amplificado) que representam o enriquecimento dos clones a favor do alvo durante os três ciclos de seleção (Tabela 2). Os títulos de entrada do 2º e 3º ciclo correspondem aos eluatos amplificados, resultantes das seleções do 1º e 2º ciclo, respectivamente. Os títulos de saída correspondem aos eluatos não amplificados resultantes de cada ciclo. Cada eluato do respectivo ciclo de seleção foi amplificado de forma a obter quantidades suficientes de fagos a serem utilizados no ciclo subsequente.

Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade ao peptídeo C10 ficaram ligados aos mesmos e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade ao alvo foram removidos durante as lavagens.

Tabela 2 - Títulos (em pfu: *plaque-forming unit*) de fagos de entrada e saída do *biopanning*.

Ciclo	C10	
	Entrada (eluato amplificado)	Saída (eluato não amplificado)
1º Ciclo	1.10^{11}	3.10^3
2º Ciclo	2.10^{11}	1.10^4
3º Ciclo	2.10^{10}	9.10^5

4.2 – Triagem por *Phage-ELISA*

Após o último ciclo do *biopanning*, 96 clones de fagos foram obtidos e amplificados em uma placa *deepwell*. Após a amplificação foi realizado ensaio ELISA para analisar a reatividade de todos os clones selecionados frente ao peptídeo sintético C10. Desta forma, observou-se que dos 96 clones de fagos frente ao peptídeo sintético C10 os mais reativos foram os clones D1, F1, B3, C2, C4, D4, B6, A7, A8 e G8 (Figura 6).

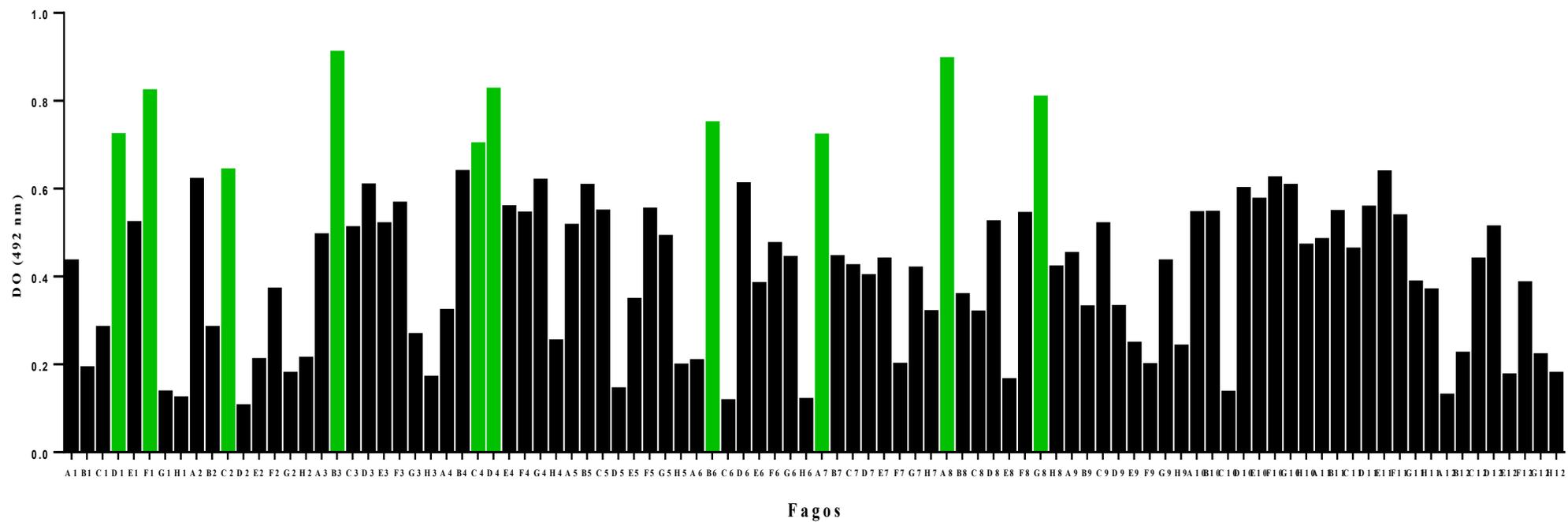


Figura 6 - Avaliação em *Phage*-ELISA da reatividade dos 96 clones de fagos selecionados utilizando o peptídeo C10. Em verde está destacado os clones com maiores valores de DO considerados com maior afinidade ao peptídeo C10. DO – densidade óptica a 492 nm.

4.3 – Sequenciamento do DNA dos fagos selecionados

Em seguida, o DNA dos fagos selecionados foi extraído e o sequenciamento foi realizado (Tabela 3). Dos fagos que se ligam ao peptídeo sintético C10, setes clones obtiveram sequências válidas: A7, A8, C2, C4, D1, F1 e G8.

Tabela 3 - Alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados pelo *biopanning*, realizado pelo programa Clustal Omega. Os dados representam sequências dos clones de fagos ligantes ao peptídeo C10.

Clones selecionados (C10)	Sequência de aminoácidos	Tamanho
A7	SASVPWGWPVSP	12aa
A8	HLWYPWKHRLPY	12aa
C2	WSWLPPNVALRN	12aa
C4	VHWDFRQWWQPS	12aa
D1	FTAPNRINSFQF	12aa
F1	GALLPSMKNKGHW	12aa
G8	FSPRPGLHSYGV	12aa

aa: aminoácidos. Representação dos aminoácidos: verde = polares, vermelho = hidrofóbicos, azul = ácidos, magenta = básicos.

Após o sequenciamento, foi realizado teste ELISA para avaliar a reatividade dos clones que possuíam sequências válidas frente ao controle negativo utilizado (BSA) e o peptídeo sintético C10. Dos clones que se ligaram ao peptídeo C10, os clones C4 e G8 (Figura 7) foram os mais reativos. Estes clones foram selecionados para uso na detecção de imunocomplexos em pacientes infectados com *S. stercoralis*.

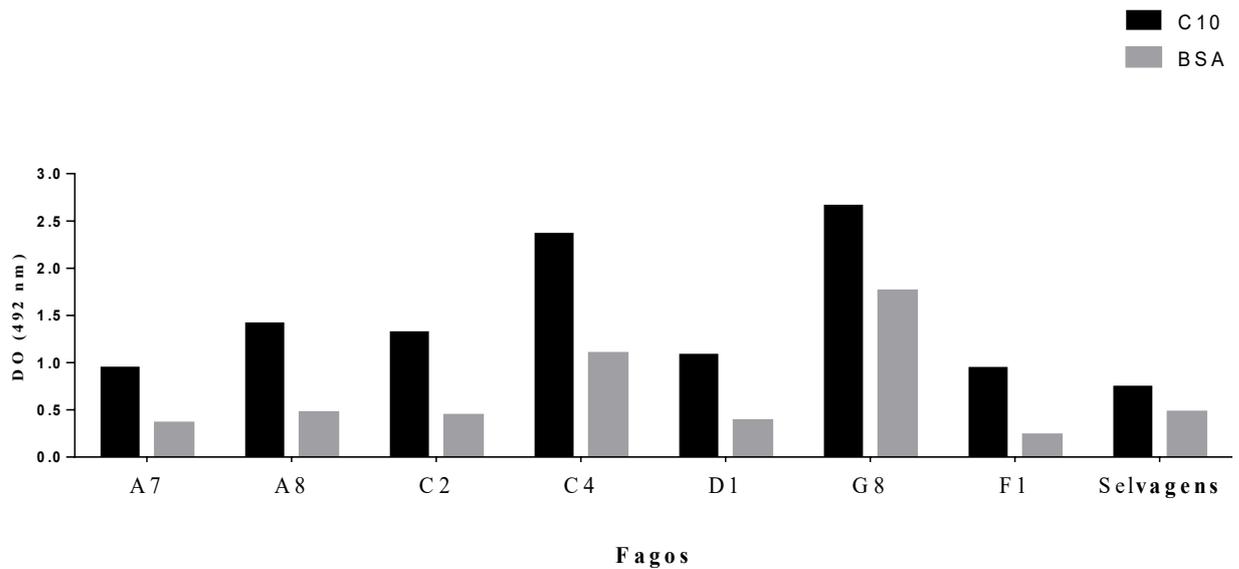


Figura 7 - ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos selecionados contra o peptídeo C10 e BSA. DO – densidade óptica a 492 nm. BSA – controle negativo.

4.4 – Detecção de imunocomplexo em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase

Para investigar a sensibilidade e especificidade dos clones em detectar imunocomplexos *phage*-ELISA foi realizado em amostras de soro dos três grupos selecionados. Dos fagos que se ligaram ao peptídeo C10, o clone C4 obteve 82,5% de positividade para o grupo 1, 17,5% para o grupo 2 e 5% para o grupo 3, enquanto o clone G8 obteve 72,5% de positividade para o grupo 1, 22,5% para o grupo 2 e 7,5% para o grupo 3. Curva ROC com área sob a curva (AUC), Sensibilidade (Se), especificidade (Sp), Acurácia (Acc) e índice de Youden (J) estão representados na figura 8 (fago C4 **A** e **B** e fago G8 **C** e **D**). O fago C4 apresentou maior desempenho diagnóstico: 83%, 89%, 79% 91% e 0,713. A AUC de superior a 0,953 e índice de Youden 0,713 (Figura 8 **A** e **B**).

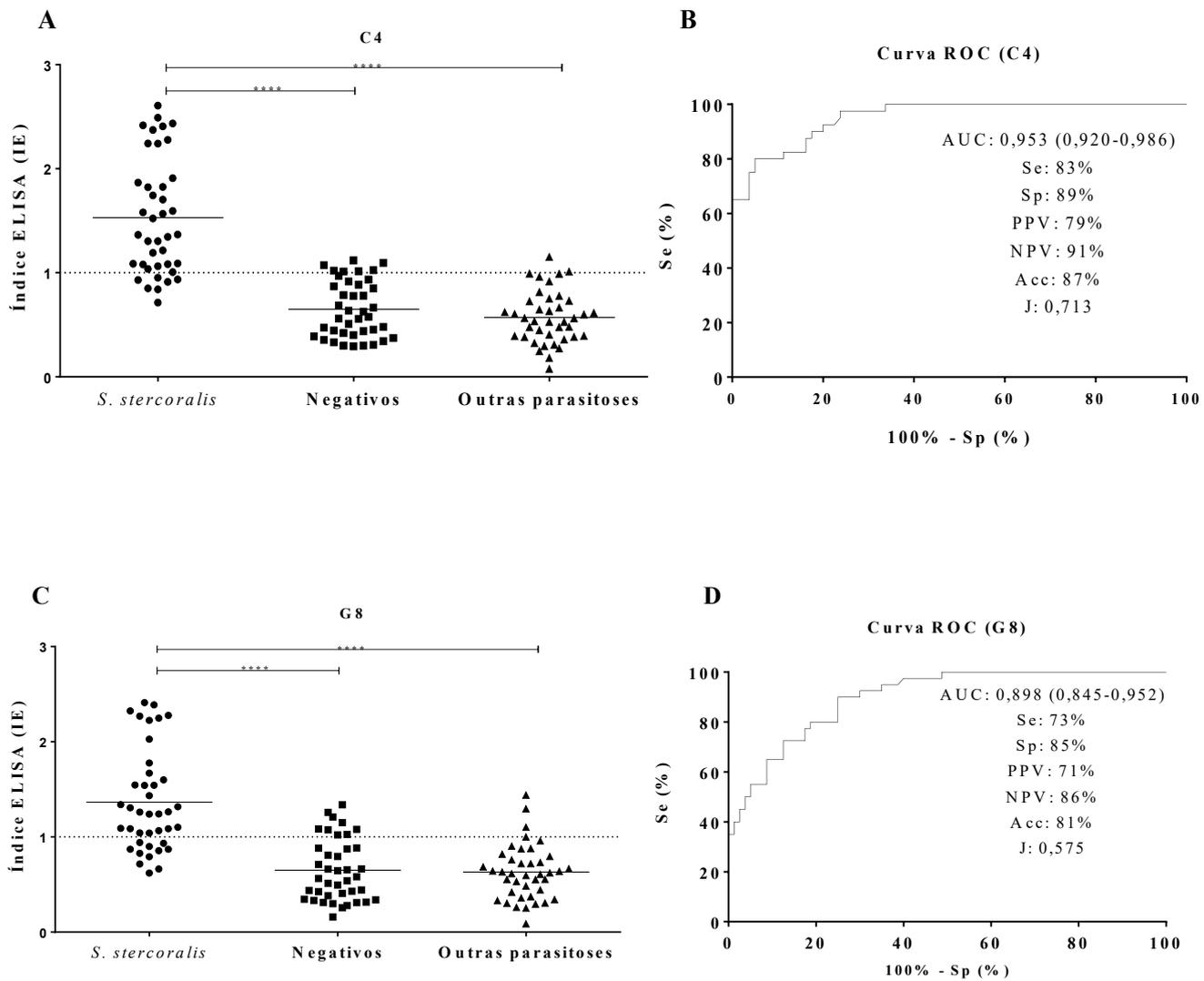


Figura 8 - Detecção de imunocomplexo por *phage*-ELISA. O ensaio foi realizado utilizando fagos ligantes ao peptídeo sintético C10 em amostra de soro de pacientes positivos para estrogiloidíase (n = 40), saudáveis (n = 40) e com outras parasitoses (n = 40), fago C4 (A) e fago G8 (C). Curvas (ROC) área sob a curva (AUC), indicando sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), acurácia (Acc) e índice de Youden (J), fago C4 (B), fago G8 (D). **** - p < 0,0001.

Em amostras de pacientes com outras infecções parasitárias ocorreram reações cruzadas: ancilostomatídeos (2/5) fago C4, (1/5) e *E. vermicularis* (2/5) fago G8 (Tabela 4).

Tabela 4 - Reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses (Grupo III, n = 40) por *Phage*-ELISA para detecção de imunocomplexos de *S. stercoralis* usando os clones de fagos.

Infecção parasitária	Fago C4	Fago G8
<i>A. lumbricoides</i> (n=5)	-	-
Ancilostomatídeos (n=5)	2	1
<i>E. histolytica/dispar</i> (n=4)	-	-
<i>E. vermicularis</i> (n=5)	-	2
<i>G. lamblia</i> (n=5)	-	-
<i>H. nana</i> (n=3)	-	-
<i>S. mansoni</i> (n=4)	-	-
<i>T. trichiura</i> (n=1)	-	-
<i>Taenia</i> sp. (n=8)	-	-
Total (n=40)	2 (5,0%)	3 (7,5%)

4.5 – Validação dos clones ligantes ao peptídeo C10 e reconhecimento antigênico

Para analisar a capacidade do fago agir como um ligante semelhante ao anticorpo para o peptídeo sintético C10, foi realizado um ELISA competitivo. Diluições crescentes foram utilizadas com *pool* de soros de pacientes com estrogiloidíase nas diluições de 40, 80, 120, 160, 200 e sem adição de soro destes pacientes. Quanto maior a concentração do soro maior a inibição da ligação (Figura 9). O fago que apresentaram a maior inibição foi o clone C4 variando de 23 a 56%. O clone G8 apresentou menor inibição de ligação (7 a 37%). Cada clone de fago foi parcialmente inibido de uma maneira dependente da dose de paciente de soro com a estrogiloidíase (Figura 9). Em contraste, nenhuma inibição (0%) foi observada pelo controle no qual não houve adição do soro de pacientes com estrogiloidíase.

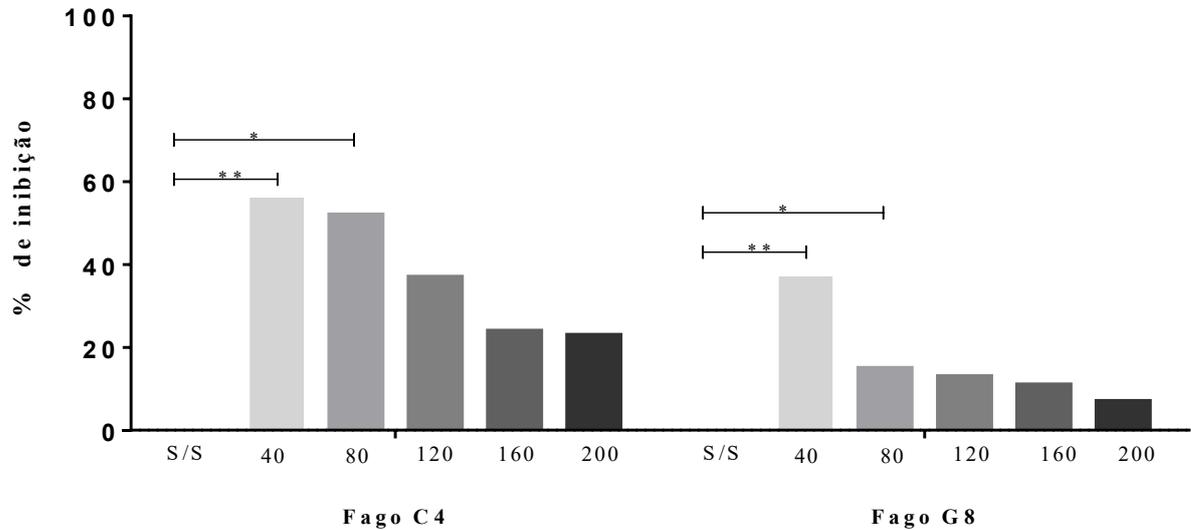


Figura 9 - Ensaio ELISA competitivo. As placas foram sensibilizadas com peptídeo sintético C10 (1 µg/poço) e cada clone de fagos selecionados (os clones C4 e G8 anti-C10) foram pré-incubadas com soros de pacientes com estrogiloidíase em diluições crescentes (40, 80, 120, 160 e 200). Um poço não foi adicionado soro (sem soro - S/S) e considerado controle negativo. * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,001$.

Para avaliar se os clones C4 e G8 reconheciam os antígenos de *Strongyloides* sp. foi realizado um ELISA indireto. Então placas de poliestireno foram sensibilizadas com antígeno de *S. venezuelensis* e incubados com os fagos selecionados e os fagos selvagens como controle. O clone C4 e G8 obtiveram DO de 2,1 enquanto os fagos selvagens 0,6 demonstrando que eles têm uma alta especificidade de ligação aos antígenos de *S. venezuelensis* (figura 10).

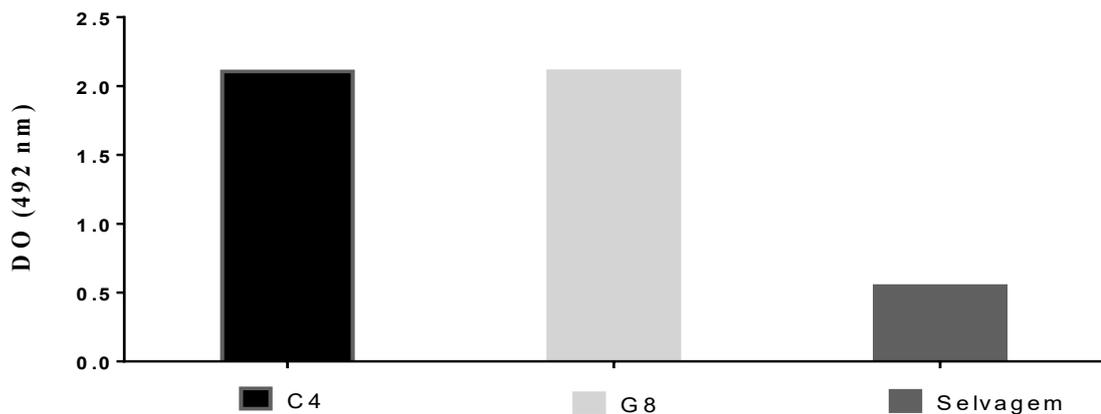


Figura 10 – ELISA indireto para avaliação da reatividade dos clones selecionados frente ao antígeno de *S. venezuelensis*. Reconhecimento antigênico. Clone de fago C4, G8 e fagos selvagens foram utilizados.

A imunofluorescência indireta foi realizada com o objetivo de reconhecimento antigênico para identificar em qual região do parasito está acontecendo a ligação dos clones. Então pode-se observar que a ligação tanto do clone C4 e do clone G8 está ocorrendo na membrana de *S. venezuelensis* (Figura 11). O mesmo ensaio foi realizado com cortes de *T. crassiceps* e foi observado que os clones não se ligam aos antígenos do parasito (Figura 12) demonstrando assim a especificidade de ligação dos clones ligantes ao peptídeo sintético C10 no reconhecimento de *S. venezuelensis*.

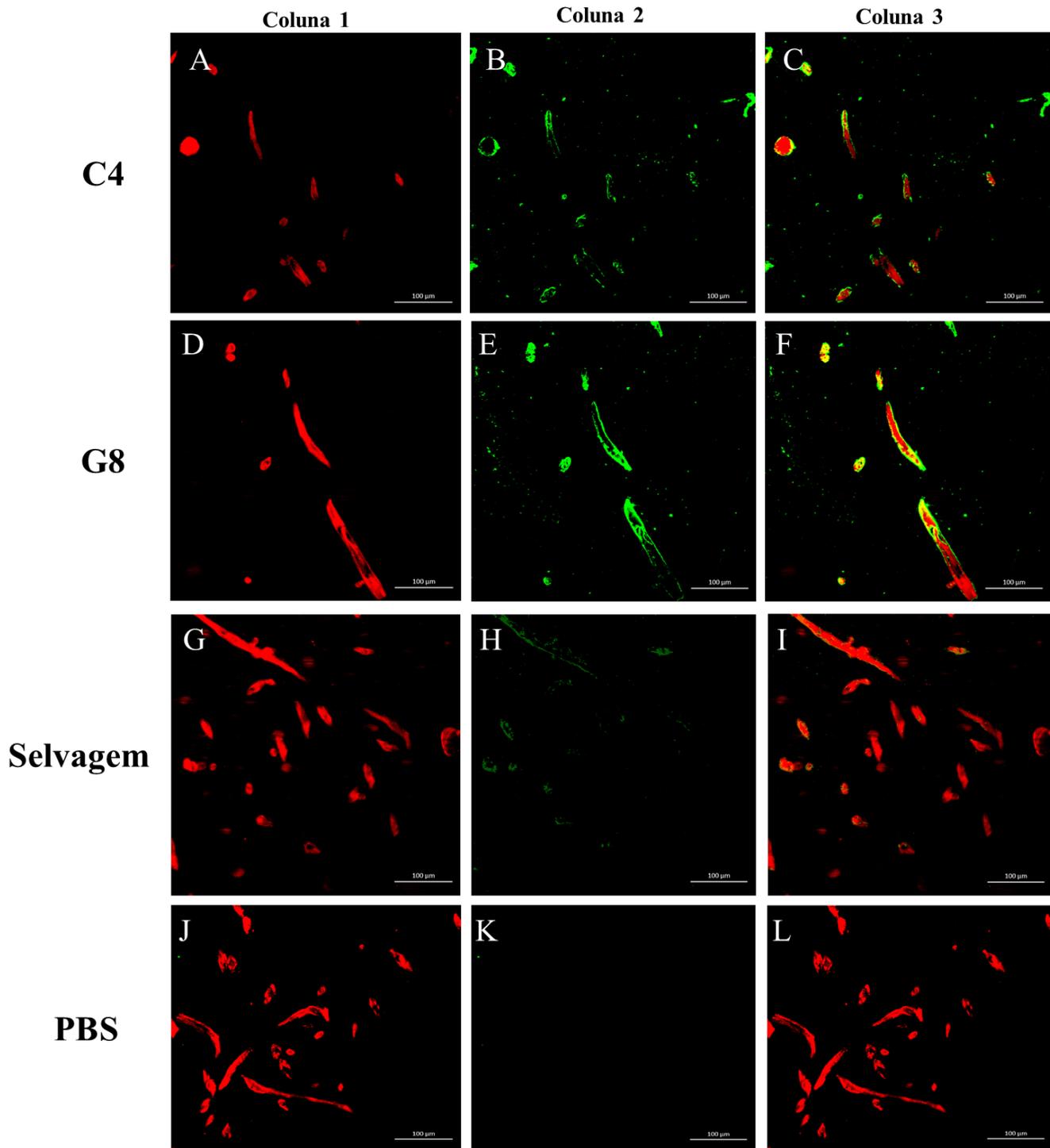


Figura 11 - Ligação dos fagos anti-C10 em cortes de *S. venezuelensis* por Reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Clone C4 (**A**, **B** e **C**), clone G8 (**D**, **E** e **F**), fagos selvagens (**G**, **H** e **I**) e PBS (**J**, **K** e **L**). Coluna 1 (vermelho): azul Evans contrastado; Coluna 2 (verde): isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna 3: resultante da fusão das colunas 1 e 2 (*merge*).

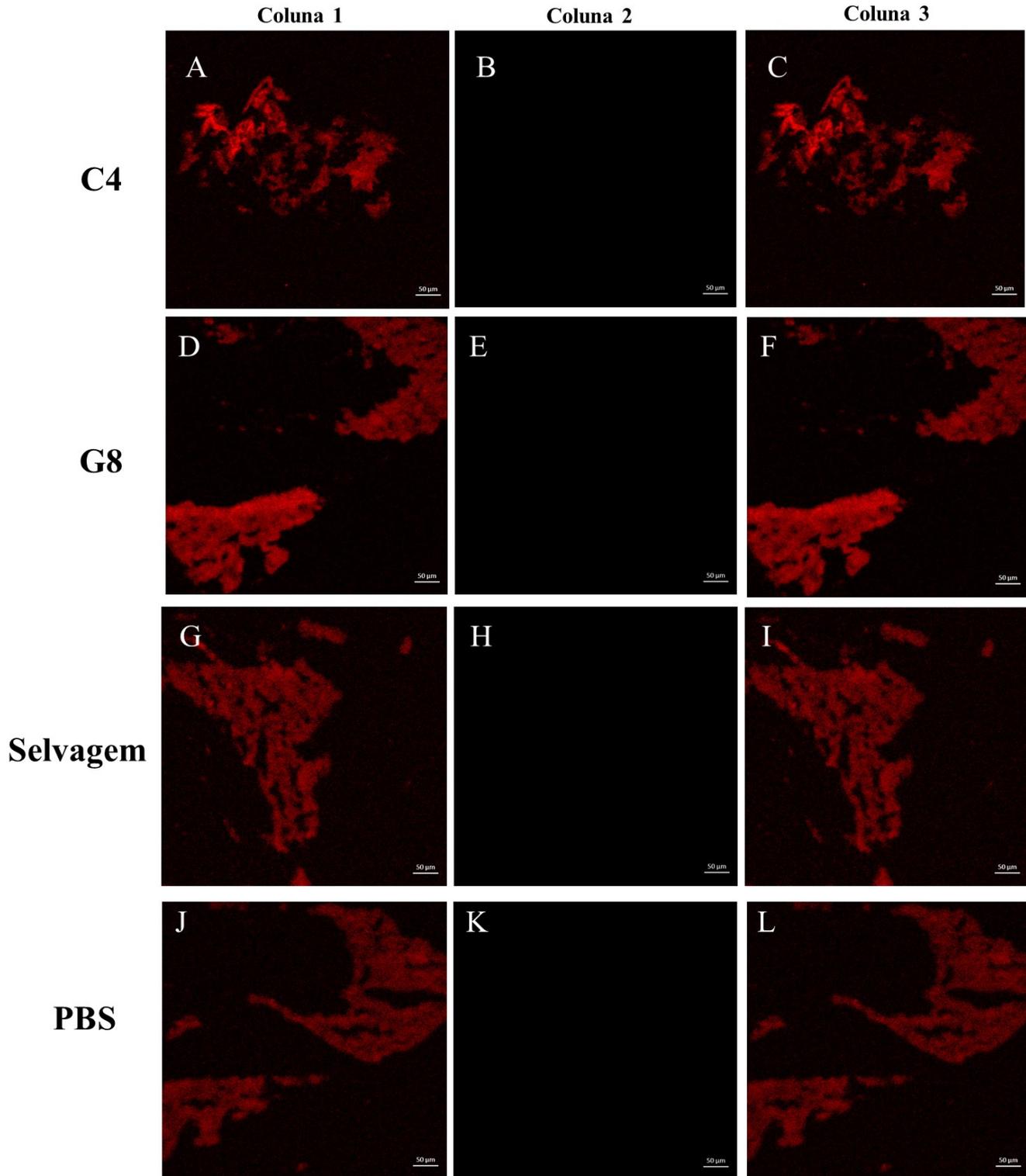


Figura 12 – Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) dos fagos anti-C10 em cortes de *T. crassiceps*. Clone C4 (**A**, **B** e **C**), clone G8 (**D**, **E** e **F**), fagos selvagens (**G**, **H** e **I**) e PBS (**J**, **K** e **L**). Coluna 1 (vermelho): azul Evans contrastado; Coluna 2 (verde): isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna 3: resultante da fusão das colunas 1 e 2 (*merge*).

Parte 2 – Potencial vacinal

4.1 – Pesagem dos animais

Na Figura 13 (A, B, C, D, E e F) pode se observar as médias dos pesos corporais de todos os animais utilizados no experimento. O peso inicial e final dos animais foi similar nos 12 grupos não apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 13).

Alúmen

Saponina

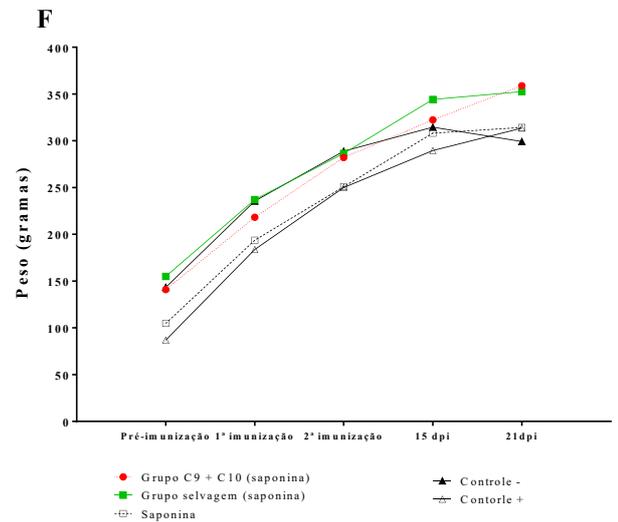
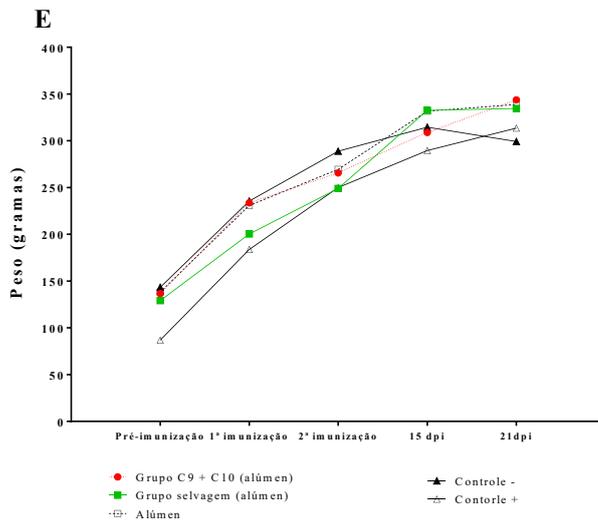
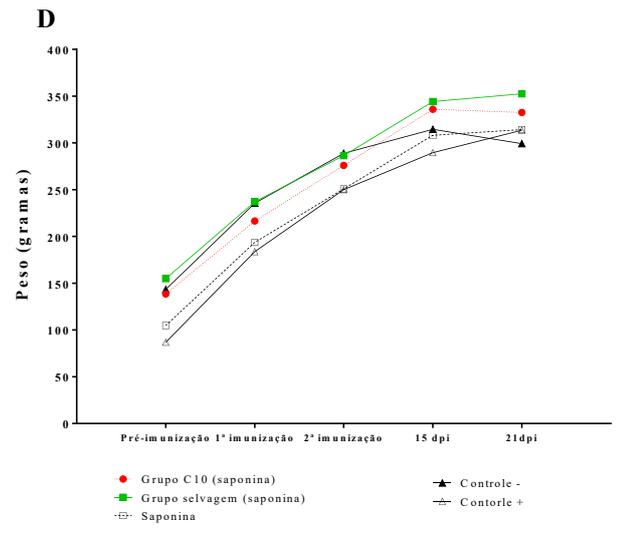
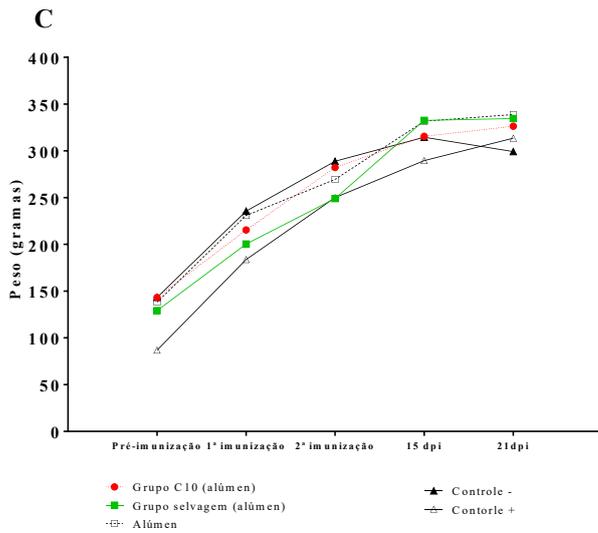
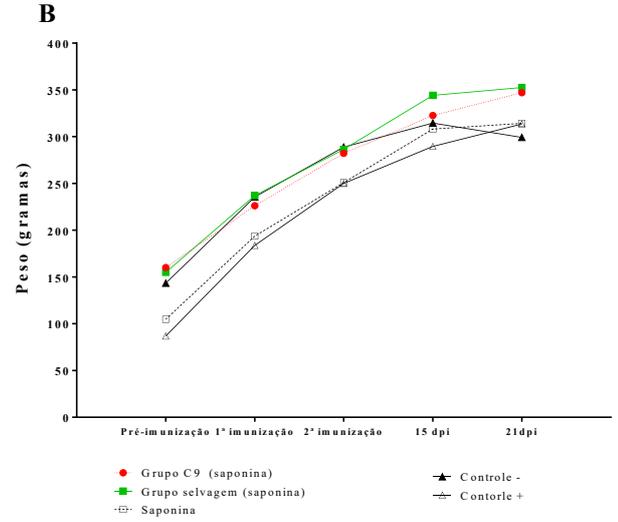
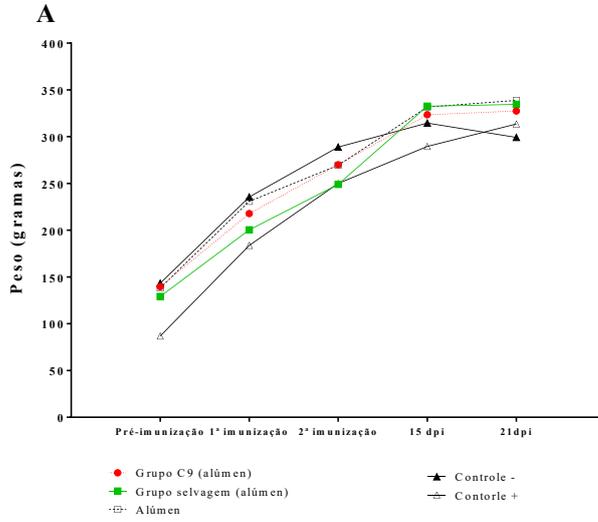


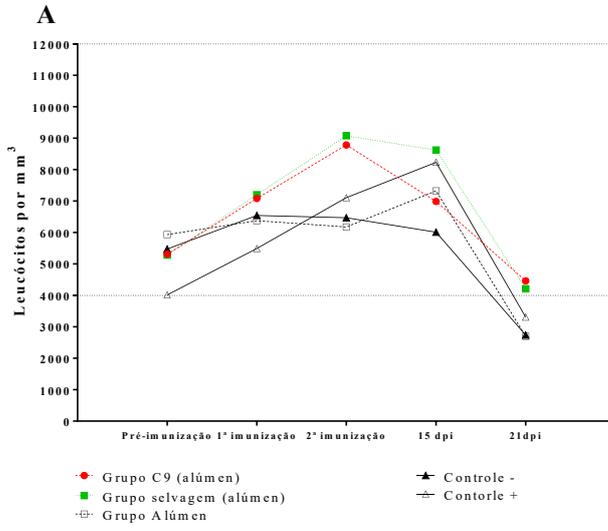
Figura 13 – Peso corporal total dos animais. Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média.

4.2 – Contagem global e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada com amostras de sangue obtidas de todos os grupos experimentais antes de iniciar a imunização (Pré-imunização) 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Ao avaliar os grupos imunizados com o adjuvante hidróxido de alumínio observou que o grupo de ratos imunizados com o clone C9 teve aumento da contagem 15 dias após a imunização (7.083 células por mm^3) e 15 dias após a segunda imunização (8.783 células por mm^3) e nos dias de infecção reduzindo a contagem (15 d.p.i 6.990 células por mm^3 e no 21º d.p.i 4.462 células por mm^3). O aumento da contagem total de leucócitos foi observado também nos grupos de ratos imunizados com o clone C10 (15 dias após a imunização 6.375 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 8.420 células por mm^3) e na combinação dos clones C9+C10 (15 dias após a imunização 7.916 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 8.541 células por mm^3) e nos ratos imunizados com fagos selvagens (15 dias após a imunização 7.200 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 9.080 células por mm^3) conforme Figura 14 (A, C e E).

Ao avaliar os grupos imunizados com o adjuvante saponina observou que o grupo de ratos imunizados com o clone C9 teve aumento da contagem total 15 dias após a imunização (7.958 células por mm^3) e 15 dias após a segunda imunização (9.320 células por mm^3). O aumento da contagem total de leucócitos foi observada também nos grupos de ratos imunizados com o clone C10 (15 dias após a imunização 7.000 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 8.691 células por mm^3) combinação dos clones C9+C10 (15 dias após a imunização 7.108 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 9.370 células por mm^3) e nos ratos imunizados com fagos selvagens (15 dias após a imunização 7.433 células por mm^3 e 15 dias após a segunda imunização 7.460 células por mm^3) conforme Figura 14 (B, D e F).

Alúmen



Saponina

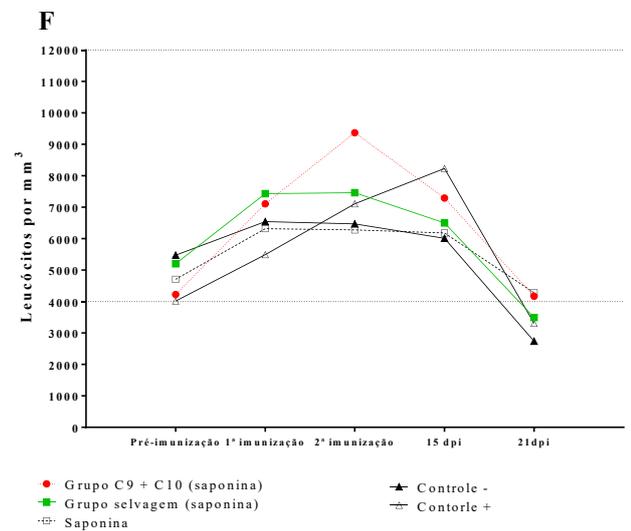
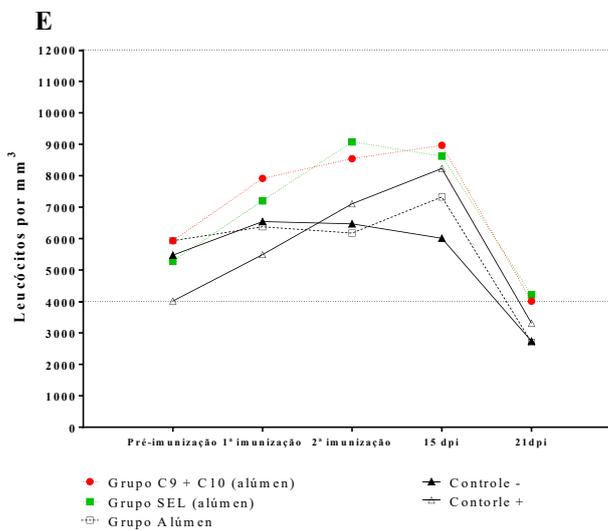
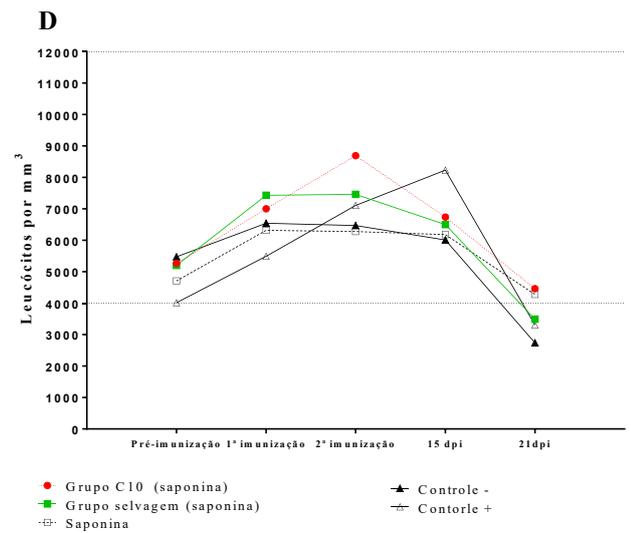
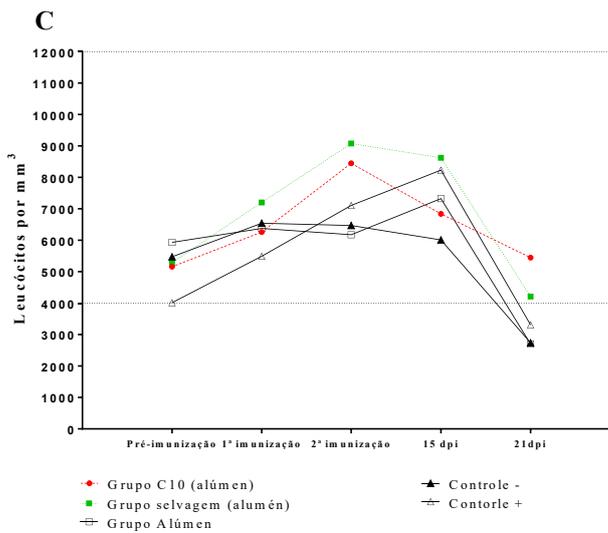
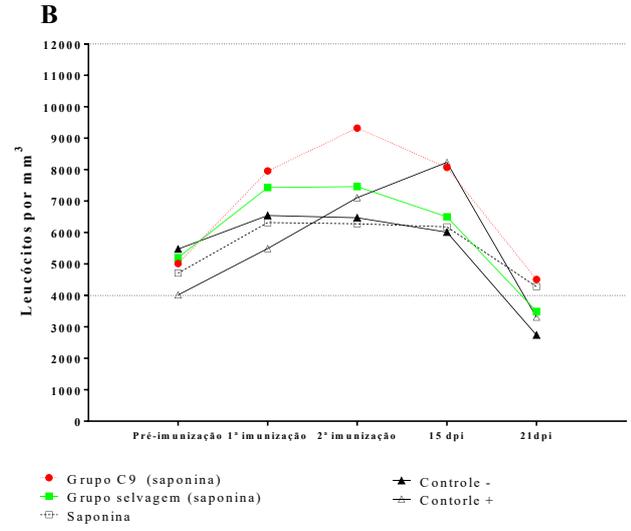


Figura 14 - Contagem global de leucócitos. Valor de referência 4000 – 12000/Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média.

O número de linfócitos nos animais controles (negativo e positivo) mantiveram-se equivalentes enquanto os animais dos grupos imunizados com fagos expressando peptídeos ou fagos selvagens tiveram uma diminuição na contagem 15 dias após a segunda imunização variando de 67% a 77% (Tabela 5).

Em relação aos neutrófilos e eosinófilos houve aumento na contagem nos grupos imunizados com fagos 15 dias após a segunda imunização variando de 22% a 29% e 1% (respectivamente) enquanto os animais controles mantiveram um padrão variando de 10% a 15%. A contagem de eosinófilos se manteve após a infecção (Tabela 5).

4.3 – Contagem de ovos de *Strongyloides venezuelensis* por gramas de fezes

Para avaliação de carga parasitária realizou-se cinética de eliminação de ovos de *S. venezuelensis* diariamente até 21 d.p.i. em amostras de fezes provenientes dos animais infectados. Em todos os grupos experimentais observou-se o início de eliminação de ovos analisadas a partir do quinto d.p.i, sendo o período entre o sexto e nono d.p.i onde foi observado maior quantidade de eliminação de ovos por grama de fezes. Nos sétimos e oitavos dias houve maior eliminação de ovos em todos os grupos. A partir do 10º dia houve uma linearidade na eliminação de ovos e no 21 d.p.i a eliminação de ovos em ambos os grupos aproximou-se de zero (Figuras 15-20).

Ao avaliar os animais do grupo imunizado com o clone C9 e alúmen observou-se redução da carga parasitária quando comparado com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 11 (Figura 15 A e B). O mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens em ambos os adjuvantes (Figura 15 C).

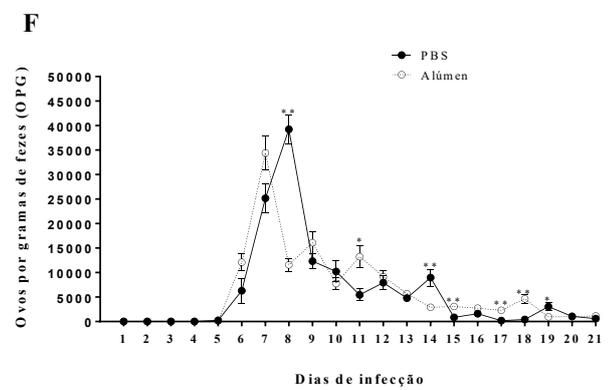
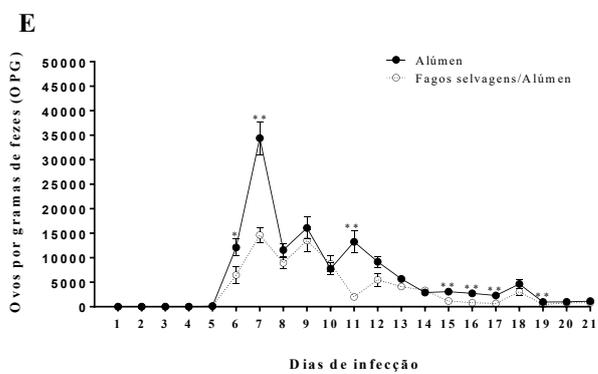
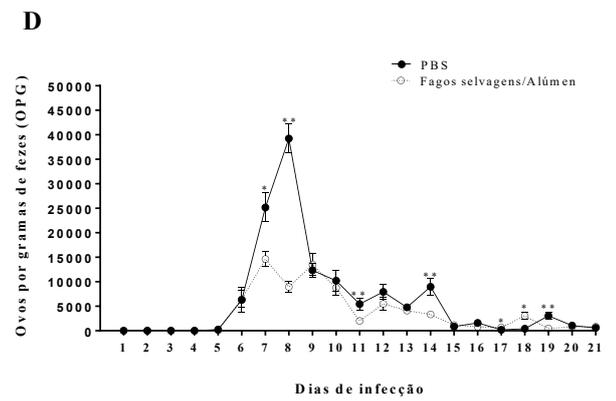
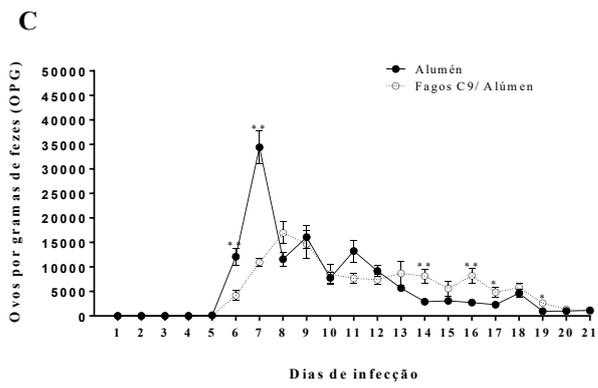
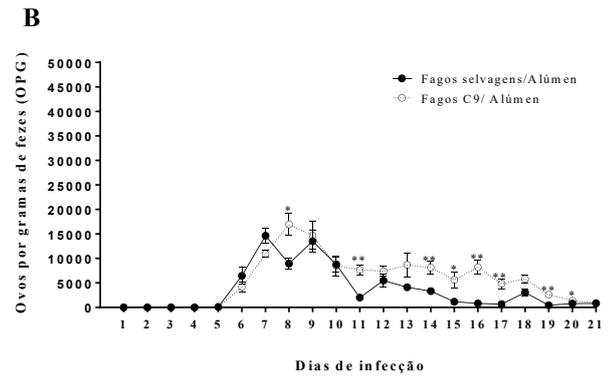
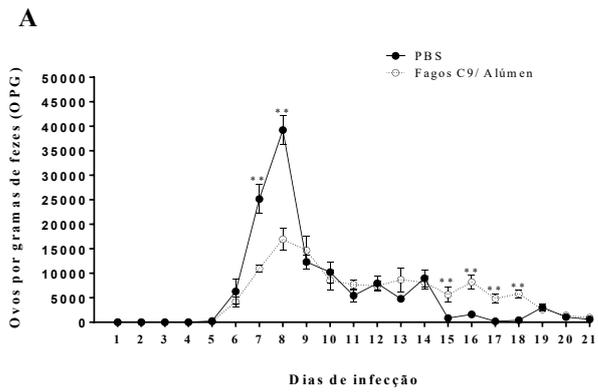


Figura 15 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo com alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Comparação da contagem de ovos por gramas de fezes dos ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com o peptídeo C9 juntamente com alúmen versus o controle positivo variou de 0% a 57%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 57 a 50%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C9 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		FECR (%)
	C9 (Alúmen)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	108	233	54
6	4.183	6.292	34
7	10.925	25.158	57
8	16.950	34.217	50
9	14.650	12.317	0*
10	8.525	10.217	17
11	7.683	5.458	0*
12	7.408	7.942	7%
13	8.683	4.783	0*
14	8.125	8.967	9
15	5.617	842	0*
16	8.192	1.608	0*
17	4.833	183	0*
18	5.833	417	0*
19	2.600	3.050	15
20	1.383	1.042	0*
21	942	600	0*

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

Ao avaliar os animais do grupo saponina imunizados com fagos expressando o peptídeo C9 observou-se redução da carga parasitária quando comparados com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 12 (Figura 16 **A** e **B**). O mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens (Figura 16 **C**).

Figura 16 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C9 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com o peptídeo C9 juntamente com saponina versus o controle positivo variou de 0% a 79%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 50 a 59%, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C9 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		% de redução
	C9 (Saponina)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	90	233	79
6	3.961	6.292	13
7	13.429	25.158	50
8	12.692	34.217	59
9	4.353	12.317	60
10	4.479	10.217	46
11	3.189	5.458	36
12	1.851	7.942	76
13	4.246	4.783	0*
14	1.218	8.967	49
15	1.094	842	0*
16	2.912	1.608	0*
17	1.960	183	0*
18	1.530	417	0*
19	1.298	3.050	74
20	598	1.042	19
21	471	600	18

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

Ao avaliar os animais do grupo imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 e alúmen observou-se redução da carga parasitária quando comparados com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 11 (Figura 17 **A** e **B**). O mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens (Figura 17 **C**).

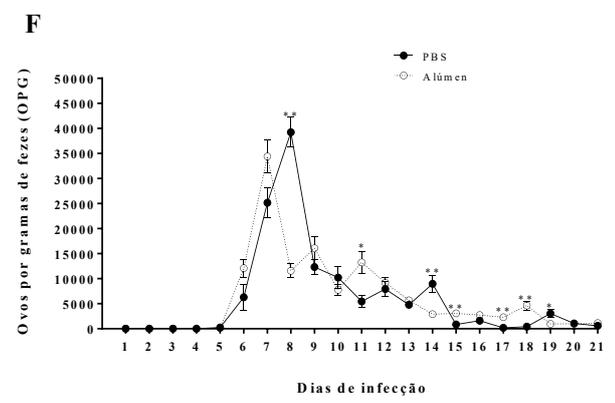
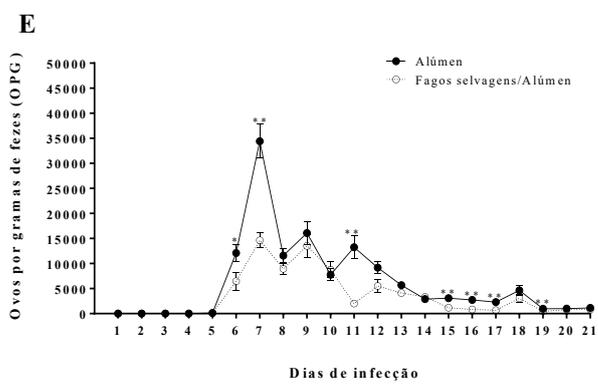
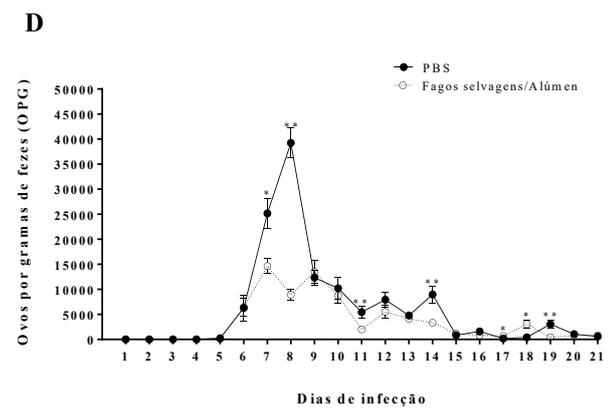
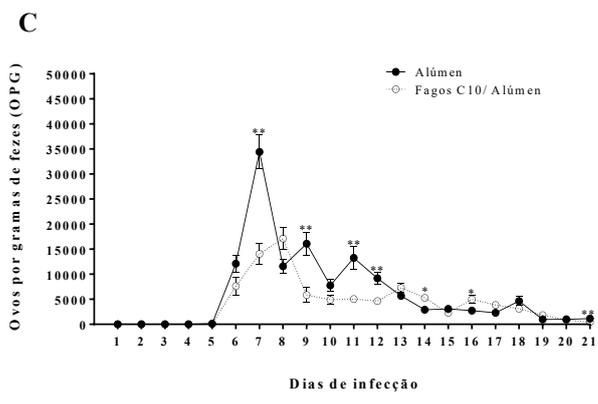
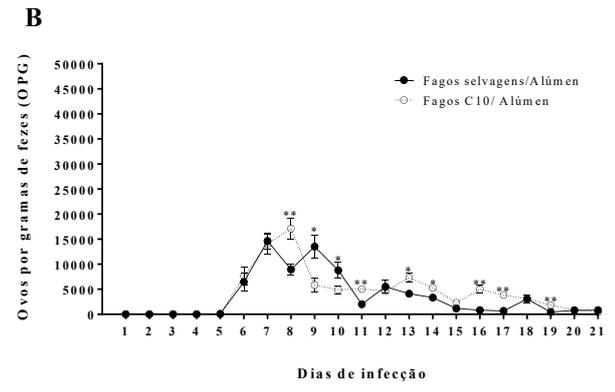
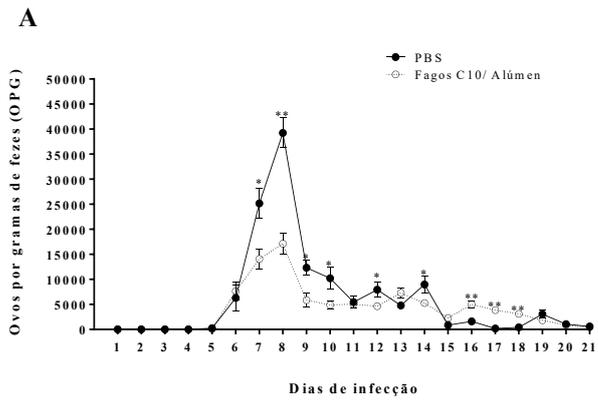


Figura 17 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes aos grupos alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * p < 0,1; ** p < 0,01.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com o peptídeo C10 juntamente com alúmen versus o controle positivo a redução variou de 0 a 79%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 44 a 50%, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		FECR (%)
	C10 (Alúmen)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	50	233	79
6	7.625	6.292	0*
7	14.058	25.158	44
8	17.125	34.217	50
9	5.858	12.317	52
10	4.892	10.217	52
11	5.042	5.458	8
12	4.625	7.942	42
13	7.292	4.783	0*
14	5.275	8.967	41
15	2.283	842	0*
16	4.975	1.608	0*
17	3.850	183	0*
18	3.108	417	0*
19	1.842	3.050	40
20	850	1.042	18
21	425	600	29

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

Ao avaliar os animais do grupo saponina imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 observou-se redução da carga parasitária quando comparados com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 12 (Figura 18 **A** e **B**). O mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens (Figura 18 **C**).

Figura 18 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com fagos C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com o peptídeo C9 juntamente com saponina versus o controle positivo a redução variou de 0% a 87%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 27 a 55%, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com fagos expressando o peptídeo C10 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		FECR (%)
	C10 (Saponina)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	50	233	79%
6	5.733	6.292	9%
7	18.358	25.158	27%
8	15.525	34.217	55%
9	4.333	12.317	65%
10	4.667	10.217	54%
11	3.450	5.458	37%
12	1.775	7.942	78%
13	5.958	4.783	0*
14	1.133	8.967	87%
15	1.633	842	0*
16	5.517	1.608	0*
17	4.992	183	0*
18	3.058	417	0*
19	1.242	3.050	59%
20	600	1.042	42%
21	533	600	11%

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

Ao avaliar os animais do grupo imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9/C10 e alúmen observou que houve redução da carga parasitária quando comparados com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 11 (Figura 19 **A** e **B**). No entanto, o mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens (Figura 19 **C**).

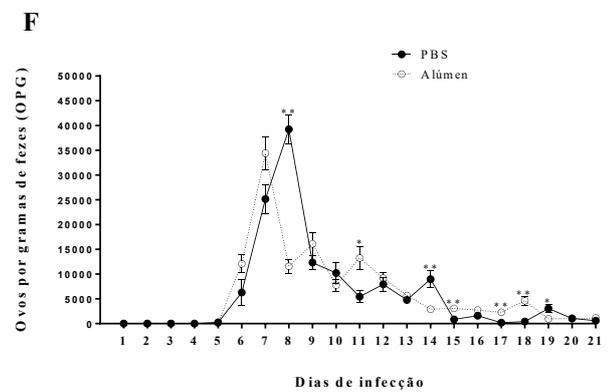
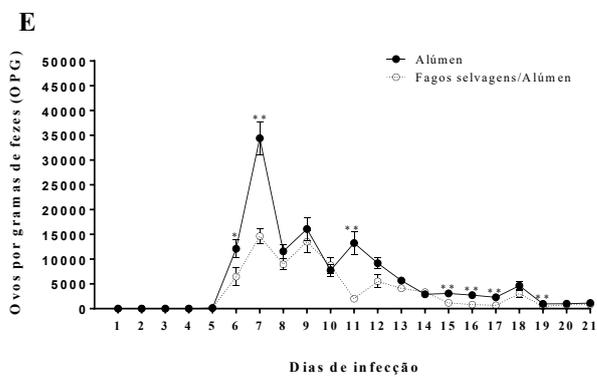
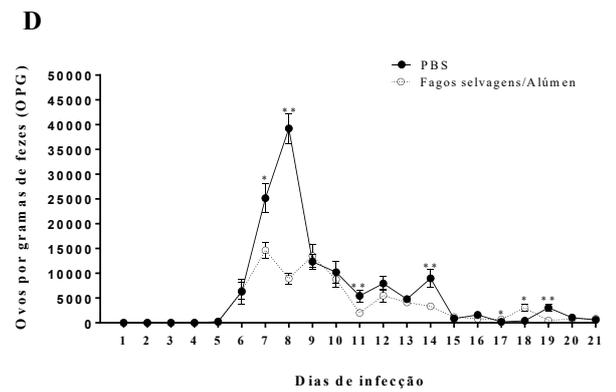
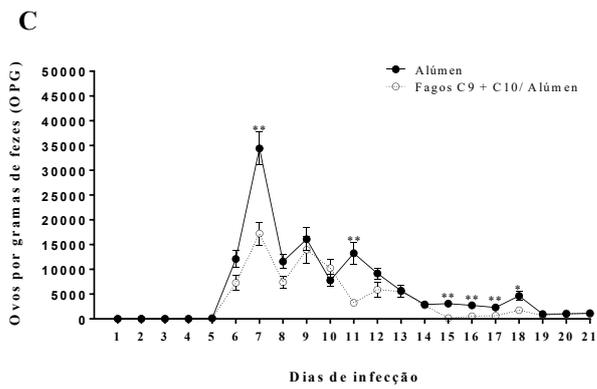
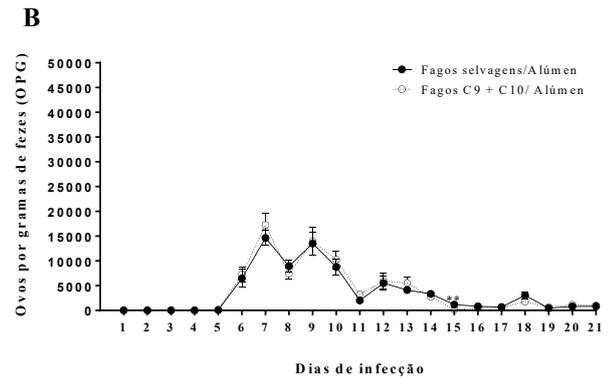
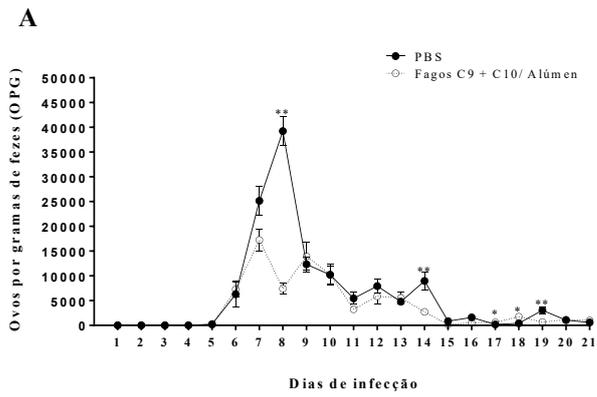


Figura 19 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes aos grupos alúmen e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com alúmen e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados alúmen e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com os peptídeos C9 e C10 juntamente com alúmen versus o controle positivo a redução variou de 0 a 100%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 44 a 78%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9 e C10 juntamente com alúmen e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		FECR (%)
	C9 +C10 (Alúmen)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	150	233	36
6	6.500	6.292	0*
7	14.000	25.158	44
8	7.400	34.217	78
9	24.850	12.317	0*
10	7.950	10.217	22
11	2.300	5.458	58
12	2.950	7.942	63
13	11.550	4.783	0*
14	3.450	8.967	62
15	0	842	100
16	800	1.608	50
17	900	183	0*
18	900	417	0*
19	1.300	3.050	57
20	2.500	1.042	0*
21	1.350	600	0*

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

Ao avaliar os animais do grupo saponina imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9/C10 observou-se que houve redução da carga parasitária quando comparados com o grupo 2 (controle positivo) e ao grupo 12 (Figura 20 A e C). No entanto, o mesmo foi observado quando comparado com os ratos imunizados com os fagos selvagens (Figura 20 C).

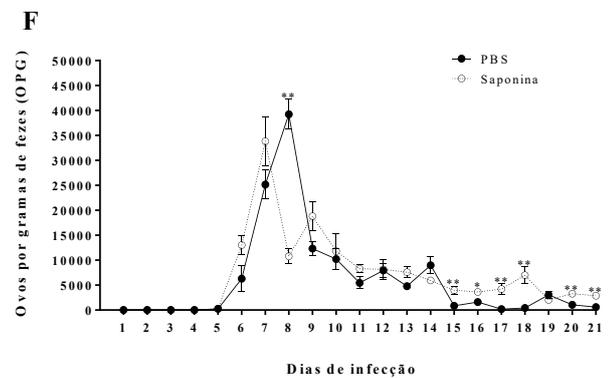
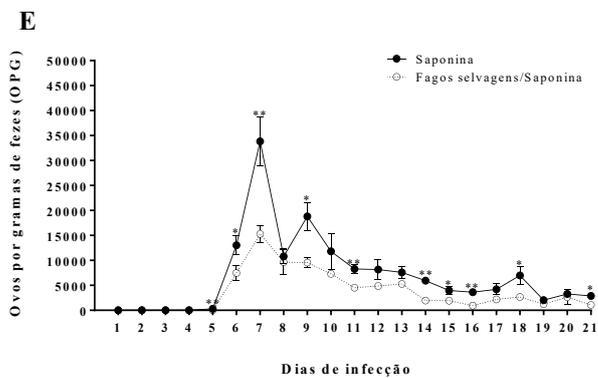
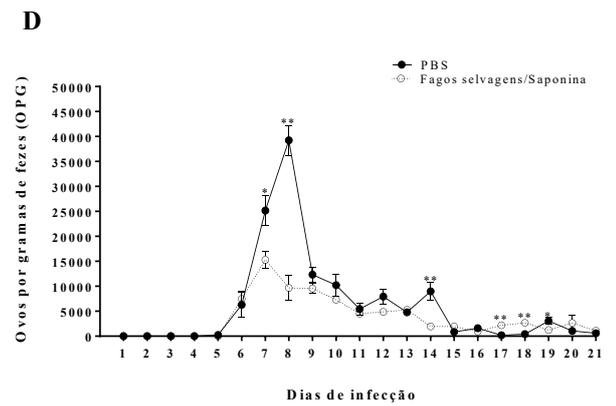
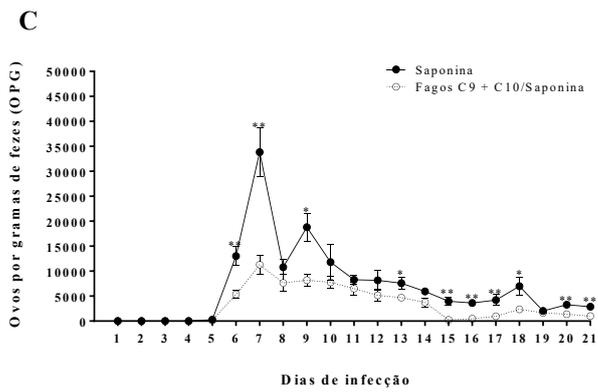
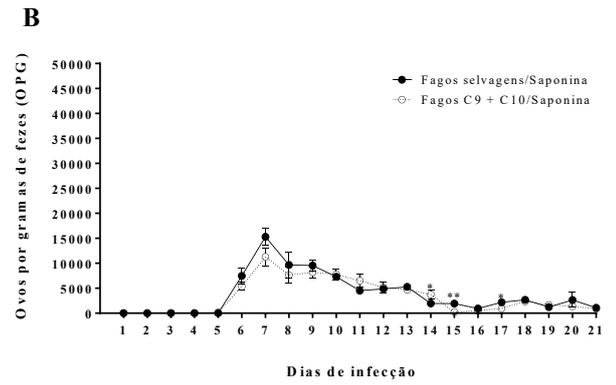
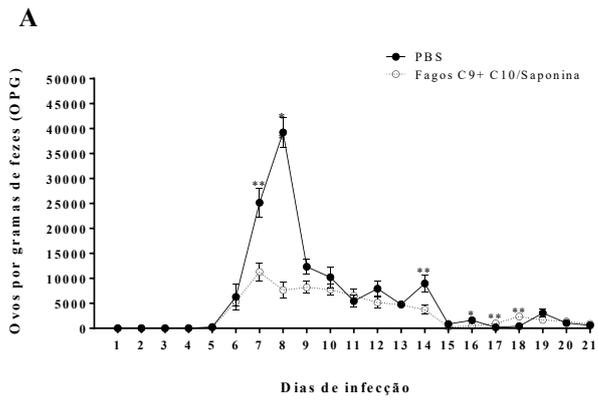


Figura 20 - Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de ratos pertencentes ao grupo saponina e infectados com *S. venezuelensis*. Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (A). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* (B). Ratos imunizados com associação dos fagos C9 mais C10 e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (C). Ratos imunizados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (D) Ratos inoculados com fagos selvagens e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com saponina e infectados com *S. venezuelensis* (E). Ratos inoculados com fagos saponina e infectados com *S. venezuelensis* comparado com animais inoculados com PBS e infectados com *S. venezuelensis* (F). Nos gráficos foram apresentados a média e o erro padrão da média. * p < 0,1; ** p < 0,01.

A porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos ratos imunizados com os peptídeos C9 e C10 juntamente com saponina versus o controle positivo, a redução variou de 0% a 82%. No sétimo e oitavo dia houve redução de 22 e 80%, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 - Média aritmética da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), seguida da porcentagem de redução de contagem de ovos nas fezes (FECR) dos grupos imunizados com a combinação dos fagos expressando o peptídeo C9 e C10 juntamente com saponina e animais controle positivo. Amostras de fezes foram coletadas partir do 1º d.p.i até 21 dias após a infecção.

Dias de infecção	Média aritmética (OPG)		FECR (%)
	C9 + C10 (Saponina)	PBS	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	100	233	57
6	5.600	6.292	11
7	19.550	25.158	22
8	6.850	34.217	80
9	7.900	12.317	36
10	8.200	10.217	20
11	1.2250	5.458	0*
12	1.850	7.942	77
13	3.750	4.783	22
14	5.600	8.967	38
15	150	842	82
16	650	1.608	60
17	450	183	0
18	1.900	417	0*
19	950	3.050	69
20	2.250	1.042	0*
21	1.350	600	0*

* Quando houve aumento da contagem de OPG do grupo imunizado a porcentagem de redução foi considerada 0.

4.4 - Cinética para detecção de IgG por ELISA

O teste ELISA foi realizado para acompanhar a cinética de produção de anticorpos IgG anti-*S. venezuelensis* no soro dos animais imunizados e nos controles. Na segunda quinzena (2ª imunização) pode-se perceber que os grupos imunizados com os fagos expressando o peptídeo C10 e os grupos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 aumentaram a produção de IgG antes da infecção desafio (Figura 21).

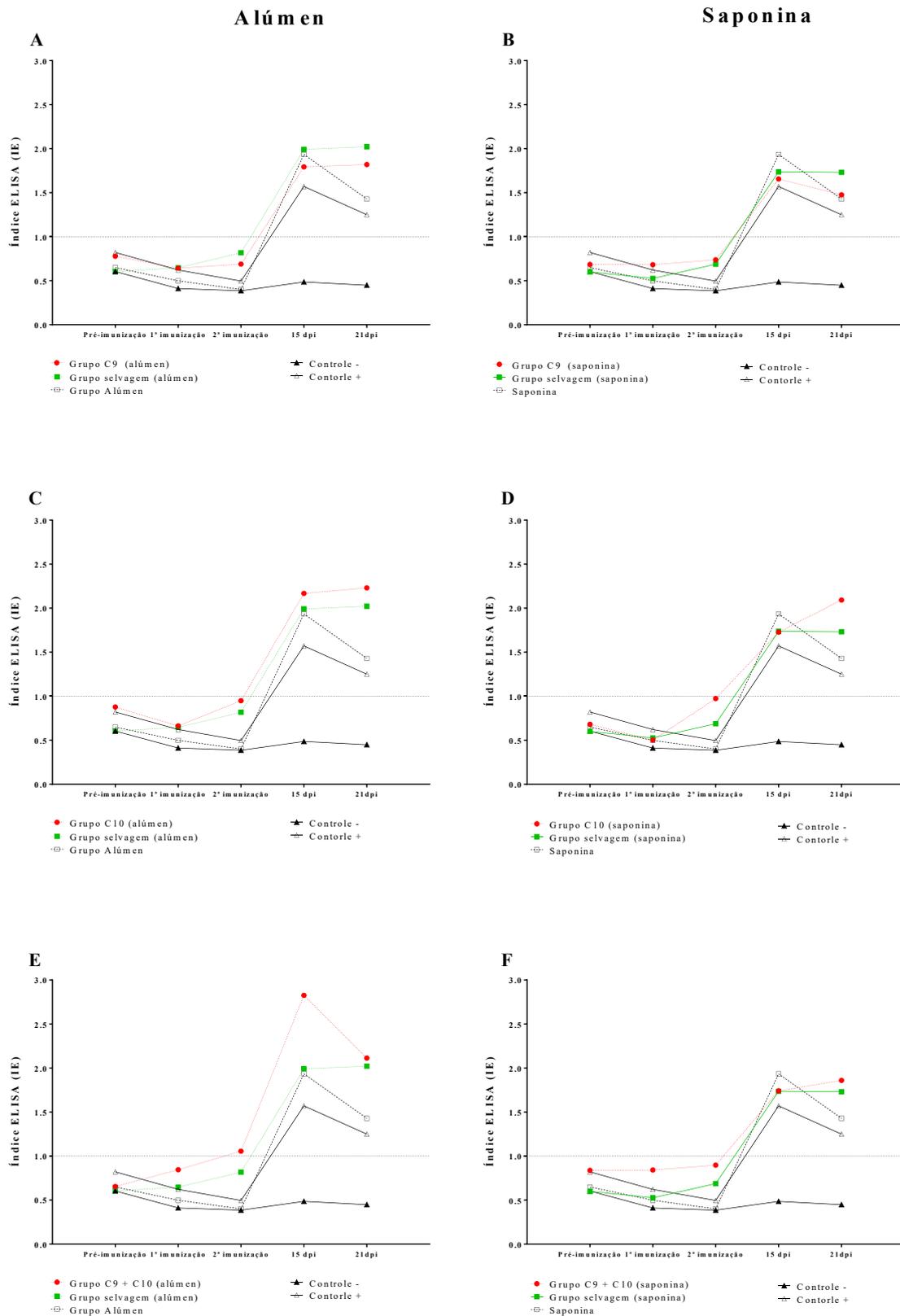


Figura 21 – ELISA de cinética de detecção de anticorpos IgG no soro de ratos realizado com amostras quinzenais. Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C9 mais alúmen (A) e saponina (B). Ratos imunizados com fagos expressando peptídeo C10 mais alúmen (C) e saponina (D). Ratos imunizados com a combinação dos fagos expressando os peptídeos C9 e C10 mais alúmen (E) e saponina (F). Pré-imunização, 15 dias após a primeira imunização (1ª imunização), 15 dias após a segunda imunização (2ª imunização) 15 dias após a infecção (15 d.p.i) e no 21º d.p.i. Resultados apresentados com média.

5 – DISCUSSÃO

Exames parasitológicos são utilizados para detectar parasitos em diferentes formas evolutivas de seu ciclo, como ovos, larvas e adultos na análise microscópica de amostras fecais (RIBEIRO; FURST, 2012). Entretanto, na estrogiloidíase humana, o número de larvas excretadas é baixo e não é eliminado diariamente, tornando o método parasitológico pouco confiável, requerendo repetidas amostras em dias alternados (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Os métodos de diagnóstico imunológico são altamente sensíveis e são de grande utilidade na avaliação da resposta imune do hospedeiro em casos assintomáticos, proporcionando esclarecimento do diagnóstico clínico e epidemiológico (LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014; REPETTO et al., 2016).

Uma das principais limitações no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos para a estrogiloidíase humana é a dificuldade em obter quantidades suficientes de antígenos de *S. stercoralis* (COSTA-CRUZ et al., 1998; RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010). Assim, o uso de peptídeos recombinantes obtidos por tecnologia de *phage display* tem sido usado com sucesso no diagnóstico de estrogiloidíase e outras doenças parasitárias. Levenhagen et al., (2015) selecionaram scFv e aplicaram na detecção de imunocomplexo em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, visando a proteína HSP60 como o antígeno alvo. Salles et al., (2017) também selecionaram com sucesso peptídeos recombinantes e aplicação no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana. Ribeiro et al., (2010) utilizaram *phage display* e selecionaram dois antígenos recombinantes para o sorodiagnóstico da neurocisticercose humana.

Os ligantes específicos isolados das bibliotecas de fagos podem ter várias aplicações, por exemplo validação de alvo terapêutico, desenho de drogas, desenvolvimento de vacinas (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010) diagnóstico de doenças infecciosas (HAIRUL BAHARA et al., 2013) e não infecciosas doenças como câncer, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas entre outras (GALÁN et al., 2016). O *phage display* é uma ferramenta com alta eficiência para gerar ligantes específicos para uma ampla gama de alvos (TAN et al., 2016) com a vantagem de ser produzido em larga escala no sobrenadante de cultura de *E. coli* (FELICIANO et al., 2014).

Neste estudo, todos os clones de fagos mostraram capacidade de diferenciar os pacientes infectados por *S. stercoralis* de indivíduos não infectados. Os valores de sensibilidade foram de 73 a 83% enquanto a especificidade foram de 85 a 89% dos clones C4 e G8, respectivamente. Os valores diagnósticos obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Feliciano et

al., 2014). A tecnologia *phage display* foi utilizada para seleção de peptídeos que mimetizam antígenos de *S. stercoralis*, capazes de detectar IgG em pacientes com estrogiloidíase. No total, 5 clones de fago (B2, B4, C9, C10 e D3) com sensibilidade variando de 80 a 87% e especificidade de 72 a 80%. Destes cinco clones foram sintetizados dois peptídeos (C10) e testados à sua reatividade na detecção de IgG em pacientes com estrogiloidíase. O peptídeo sintético C10 apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 86%, enquanto o peptídeo sintético D3 apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 92% (FELICIANO et al., 2016). Assim, torna-se evidente que o uso de peptídeos sintéticos aumenta tanto a sensibilidade quanto a especificidade no diagnóstico de estrogiloidíase, uma vez que pode eliminar a reatividade cruzada com o fago selvagem.

Os fagos estão presentes em uma grande diversidade de biomas, inclusive na microbiota humana (NAVARRO; MUNIESA, 2017), principalmente no trato gastrointestinal. Algumas alterações na composição da microbiota bacteriana são fortemente influenciadas pelos bacteriófagos (LÓPEZ et al., 2017) que em humanos podem atuar sobre diferentes mecanismos do sistema imunológico (NAVARRO; MUNIESA, 2017). O sistema imunológico produz anticorpos específicos contra os fagos, bem como citocinas pró-inflamatórias, que podem regular a microbiota intestinal (MIRZAEI; MAURICE, 2017). Portanto, a presença de falsos positivos pode ser confirmada pela reatividade da IgG contra os fagos, porque eles são da microbiota normal em humanos.

A reatividade cruzada foi observada com ancilostomatídeos e *E. vermicularis*. Entre os clones, o C4 apresentou a menor reatividade cruzada de 5% e o G8 apresentou a maior com 7,5%. Uma das principais preocupações no desenvolvimento de testes sorológicos é a reatividade cruzada com outros parasitos que pode estar associada à semelhança antigênica e filogenética entre as espécies de helmintos. Assim, pode causar resultados falso-positivos e, conseqüentemente, diminuir a especificidade do teste ELISA, especialmente quando se utiliza extratos brutos (BISOFFI et al., 2013; BUONFRATE et al., 2018).

No ensaio ELISA competitivo foi observado redução, variando de 11% a 53% da reatividade dos clones de uma maneira dose-dependente, permitindo afirmar que os clones de fagos selecionados pela tecnologia podem atuar como um *antibody-like* para o peptídeo C10. Reis et al. (2013) utilizaram a mesma abordagem para selecionar ligantes peptídicos específicos para células de câncer de tireoide, o que permitiu identificar um biomarcador *antibody-like* que reconhece os nódulos tireoidianos e pode ajudar a distinguir as lesões com padrão folicular.

Ainda não foi elucidado a(s) qual(is) proteína (as) o peptídeo C10 corresponde em *Strongyloides* sp. No estudo conduzido por Feliciano et al. (2014), foi realizada análise de

bioinformática para alinhar sequências peptídicas com proteínas putativas de *S. stercoralis*. O peptídeo C10 alinhado com quatro proteínas sendo a *cytochrome c oxidase subunit I*, *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit*, *insulin-like receptor protein tyrosine kinase isoform A* e B.

Na avaliação dos potenciais vacinais foram utilizados somente animais *Specific-pathogen-free* (SPF). O uso de roedores de laboratório em pesquisa biomédica tem proporcionado melhor entendimento dos processos patológicos humanos e veterinários. Portanto, a qualidade, confiabilidade e consequente padronização de técnicas para a manutenção adequada desses animais tem impacto significativo na pesquisa, principalmente porque apenas animais saudáveis, livres de patógenos, podem produzir dados científicos válidos (BICALHO et al., 2007; TANIDEH et al., 2010). Em estudo conduzido por Sousa et al., (2016) foi avaliada a reatividade cruzada entre amostras de soro de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados com *Syphacia muris* e infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Os resultados demonstraram que a quantidade de ovos eliminados de *S. venezuelensis* e fêmeas partenogênicas diminuíram significativamente nos casos de coinfeção por *S. muris*. O ELISA revelou 100% de reatividade cruzada de amostras de soro de ambas as espécies contra o antígeno oposto. A reatividade cruzada de IgG foi confirmada por RIFI utilizando secções de tecidos de larvas de *S. venezuelensis* e adultos de *S. muris*. No *immunoblotting* mostrou que os anticorpos IgG dos soros dos animais infectados com *S. muris* reconheciam oito bandas antigênicas do extrato salino de *S. venezuelensis* e que os anticorpos IgG dos soros de animais infectados com *S. venezuelensis* reconheciam sete bandas do extrato salino de *S. muris*.

Ao comparar os animais imunizados com fagos pode-se observar que houve aumento na contagem de neutrófilos e eosinófilos 15 dias após a segunda imunização variando de 22% a 29% para neutrófilos e 1%. Após a infecção com *S. venezuelensis* a contagem de eosinófilos se manteve 1%. Rajamanickam e colaboradores (2018) demonstraram que os níveis de eosinófilos, neutrófilos e proteínas granulares de mastócitos estão significativamente aumentados em pacientes infectados com *S. stercoralis* quando comparado com pacientes não infectados. Após seis meses do tratamento anti-helmíntico os níveis destas células como das proteínas granulares diminuem significativamente em pacientes com estrongiloidíase. Isso indica que a liberação dessas proteínas granulares está intimamente relacionada à presença de infecção helmíntica ativa e que a eliminação do parasito remove o estímulo para maior liberação desses fatores.

Os eosinófilos e neutrófilos são os principais componentes do sistema imunológico no

combate a infecção por *Strongyloides* spp. tanto na resposta inata como na adaptativa. Assim que são recrutados podem atuar em diferentes respostas. Na resposta inata os eosinófilos podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APC) e estimular a produção de antígeno-específico e citocinas Th-2, incluindo IL-4 e IL-5 (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017). Mas, pode atuar também na morte de larvas infectantes. As proteínas granulares de eosinófilos, como a *major basic protein* (MBP) em humanos e *eosinophil cationic protein* (ECP) são tóxicas para as larvas infectantes. Os neutrófilos atuam na morte das larvas e indução de produção de imunoglobulinas. A morte das larvas é devido a sua degranulação e liberação de mieloperoxidase (MPO) que são tóxicas ao parasito (BRELOER; ABRAHAM, 2017). Os neutrófilos mediados por IL-4 induzem a produção de imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina IgG4 e IL-8 por *class-switch* dos linfócitos B ativados (MOBLEY; DHALA; GHOBRIAL, 2017).

As vacinas precisam além de antígeno(s), um adjuvante para estimular a resposta imune. Enquanto o antígeno direciona a resposta imunológica, o adjuvante define a sua natureza, isto é inflamatório ou anti-inflamatório, e a potência dessa resposta, independentemente da natureza do antígeno (MARCIANI, 2018). No presente estudo foram utilizados dois adjuvantes em formulações vacinais para a estrogiloidíase experimental: o hidróxido de alumínio (alúmen) e a saponina. Os adjuvantes de alumínio estimulam resposta do tipo Th2 (DEL GIUDICE; RAPPUOLIA; DIDIERLAUREN, 2018) e as saponinas induzem resposta tipo Th1 (SUN; XIE; YE, 2009).

A aplicação vacinal foi realizada em ratos imunocompetentes demonstrando ser satisfatória, uma vez que nenhum efeito adverso foi constatado durante a realização dos experimentos. O ganho de peso dos animais manteve-se equivalente durante todo o experimento. Os critérios envolvidos na escolha das formulações para uma dada vacina incluem a natureza dos componentes antigênicos, tipo de resposta imunitária desejado, via de administração preferida, evitar efeitos adversos consideráveis e a estabilidade da vacina. Todos os componentes da vacina como o adjuvante, o antígeno, devem ser seguros, estáveis antes da administração, prontamente biodegradado e eliminado, capaz de promover uma resposta imune específica ao antígeno e de produção acessíveis (REED et al., 2009).

Os ratos imunizados com os clones C9 e C10 juntamente com o adjuvante alúmen reduziu a contagem de ovos de *S. venezuelensis* nas fezes (0-100%). Em estudo realizado por Abraham e colaboradores (2011) foi utilizado antígeno recombinante de *S. stercoralis* (Ss-IR) para imunizar camundongos juntamente com hidróxido de alumínio (alúmen). Após a imunização foi realizada infecção desafio com larvas de *S. stercoralis*. Apenas camundongos

imunizados com o antígeno Ss-IR (alúmen) demonstraram diminuição significativa de aproximadamente 80% na sobrevivência de larvas na infecção desafio. Em estudo realizado por Guasconi e colaboradores (2012) foi avaliada a capacidade do extrato total de *Fasciola hepatica* juntamente com alúmen proteger bezerros contra a fasciolose experimental. Comparado com o grupo infectado, os animais imunizados com alúmen apresentaram redução de ovos liberados nas fezes de 89%. Em contraste com os dados apresentados em estudo desenvolvido por Pacífico e colaboradores (2006) foi avaliado a capacidade da proteína de 22.6 kDa de *S. mansoni* (Sm22.6) em associação com alúmen de induzir em camundongos proteção contra *S. mansoni*. A imunização somente com a proteína isolada Sm22.6 ou combinada com alúmen não induziu proteção contra a infecção desafio das cercarias de *S. mansoni*.

Os animais imunizados com fagos expressando os peptídeos C9 e C10 (e a combinação dos dois) juntamente com o adjuvante saponina reduziu a carga parasitária de *S. venezuelensis* (0-87%). Estudo conduzido por Vlaminck e colaboradores (2010) encontraram resultados semelhantes. Ao avaliarem duas formulações vacinais utilizando o extrato ácido doxicólico de larvas de estágio 3 de *S. venezuelensis* (DOCSv) com saponinas de *Quillaja saponaria* (Qs), extrato hidroalcoólico de *Phlebodium pseudoaureum* (PAL) ou o aminoálcool AA0029 em camundongos. O antígeno DOCSv utilizado juntamente com Qs + PAL induziu altos níveis de proteção em termos de redução na contagem de ovos fecais (93,2-99,4%) enquanto camundongos imunizados com DOCSv juntamente com Qs + AA0029, mostraram redução de 73,7-97,0% na contagem de ovos fecais. Em estudo realizado por Villa-Mancera e colaboradores (2014) trinta cabras foram imunizadas com 1.10^{14} partículas de fago dos clones mimotopos de catepsina L1 (fagos 11 e 13). As cabras foram imunizadas com fagos 13 (sem adjuvantes) e 13 com o adjuvante Quil A e o fago M13KE selvagem. O grupo controle recebeu solução salina tamponada com fosfato. Todos os grupos foram desafiados com 200 metacercárias de *F. hepatica*. As cargas médias de adultos após desafio foram reduzidas em 46,91% e 79,53% em cabras imunizadas com os clones 13 e 13 com Quil A, respectivamente. Nenhum efeito foi observado em animais imunizados com o clone fago M13KE.

Os animais que foram imunizados com fagos selvagens também reduziram a contagem de ovos por gramas de fezes em vários d.p.i. Nos animais ou no homem pode ocorrer propagação dos bacteriófagos, assim que penetram no sangue e em tecidos livremente após a sua administração por diferentes vias (incluindo oral). Eles podem multiplicar nos locais de infecção bacteriana. Além disso, os fagos mantêm completa atividade biológica nesses locais. Desta forma, anticorpos anti-fago são produzidos e tanto a imunidade inata quanto a humoral estão envolvidas na remoção do bacteriófago em mamíferos (DABROWSKA et al., 2005).

A literatura descreve que o maior pico de eliminação de ovos de *S. venezuelensis* ocorre no 8º dia após infecção (MARQUES et al., 2016; SOUSA et al., 2016). Ao comparar os resultados do 8º dia dos animais imunizados com alúmen e fagos expressando o peptídeo C9, peptídeo C10 e a combinação ambos (C9 e C10) observou-se que as taxas de redução de ovos nas fezes foram de 50, 50 e 78% (respectivamente) enquanto que os ratos imunizados com saponina foram de 59, 55 e 80% (respectivamente). Desta forma pode-se perceber que houve redução de OPG semelhante no pico de eliminação, sendo os grupos imunizados com a combinação C9+C10 (alúmen e saponina) apresentaram uma maior redução de ovos nas fezes. Em estudo conduzido por Lampe e colaboradores (2017) foi avaliada a ação do antígeno recombinante de *Echinococcus multilocularis* (Em14-3-3) com diferentes adjuvantes, incluindo Quil A®, alúmen e muramil dipeptídeo (MDP) para imunizar macacos Rhesus e fazer o desafio com *E. multilocularis*. Todos os animais vacinados desenvolveram anticorpos específicos para o antígeno. Enquanto o Quil A® induziu reação adversa local da aplicação, o alúmen provou ser o mais potente adjuvante em termos de níveis de anticorpos, longevidade e tolerabilidade. Em contrapartida Geldhof e colaboradores (2017) avaliaram a utilização de uma fração de antígeno de excreção e secreção de *Ostertagia ostertagi* enriquecida para atividade da proteinase cisteína (ES-tiol) e dois adjuvantes Quil A e alúmen em desenvolver ação protetora em bezerros contra o nematódeo *O. ostertagi*. Os bezerros imunizados com ES-tiol Quil A tiveram adultos e ovos significativamente diminuídos quando comparado com o grupo controle e enquanto não foram observadas nenhuma diferença do grupo imunizado com ES-tiol e alúmen quando comparado com o controle.

O alúmen é o adjuvante mais comum em vacinas e tem registro de uso bem-sucedido na vacinação humana, pois promove imunidade protetora mediada por anticorpos (OLESZYCKA; LAVELLE, 2014; BURAKOVA et al., 2018). Entre outros mecanismos de ação dos adjuvantes de alumínio está a ativação do complemento, eosinófilos e macrófagos e efeitos secundários são o aumento da produção de IgE e alergenicidade (AGUILAR; RODRÍGUEZ, 2007). Há grande interesse no mecanismo de imunidade induzida por alúmen, uma vez que não é totalmente compreendido como este adjuvante fornece proteção e porque é relativamente ineficaz na promoção de respostas celulares. Um interesse particular tem sido demonstrado na imunidade inata induzida por alúmen, uma vez que este sistema é fundamental para modular as funções de início e efector da resposta imune adaptativa (OLESZYCKA; LAVELLE, 2014).

As saponinas são compostos anfipáticos de uma ou mais partes glicosídicas hidrofílicas ligadas a um derivado triterpênico lipofílico. O adjuvante à base de saponina mais proeminente é o Quil-A que é uma mistura heterogênea de saponinas solúveis em água extraídas de *Quillaja*

saponaria, uma árvore nativa da América do Sul. Devido à sua toxicidade, o Quil-A não é adequado para vacinas humanas e é amplamente utilizado em aplicações veterinárias (BURAKOVA et al., 2018). Outro fator é que as saponinas causam hemólise das células vermelhas do sangue *in vitro* (RAJPUT et al., 2007).

Assim que um parasito consegue estabelecer a infecção, o hospedeiro tenta o eliminar por meio das barreiras epiteliais, imunidade inata e imunidade adquirida. No entanto, os parasitos podem evitar e regular as respostas imunitárias, criando assim um ambiente ideal para sua própria maturação e reprodução, permitindo, ao mesmo tempo, que o hospedeiro sobreviva, evitando danos excessivos. O hospedeiro é capaz de ajustar suas respostas imunes para expulsar o parasito sem exacerbação da resposta, e para evitar a supressão excessiva que prejudicaria sua capacidade de proteger contra outros patógenos. Esses processos imunológicos conflitantes ocorrem em muitas infecções parasitárias e são suficientemente controlados para que uma resposta não se torne excessiva, assim como a resposta às bactérias comensais (YASUDA; NAKANISHI, 2018).

A seleção de peptídeos utilizando a técnica *phage display* e sua aplicação em formulações vacinais na estrogiloidíase experimental é inovadora. A tecnologia *phage display* representa atualmente uma enorme promessa para encontrar novas estratégias de descoberta e produção de vacinas e os avanços atuais prometem um futuro inovador para o desenvolvimento de diferentes plataformas de vacinas utilizando fagos (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016). No entanto, é necessária a compreensão da imunobiologia e mecanismo(s) de proteção. Além disso, fatores mais técnicos precisam ser melhor explorados, como por exemplo, quantas e quais doses dessas formulações são indicadas, qual rota de imunização é ideal (parenteral, oral, subcutânea ou intranasal) e por quanto tempo as respostas da memória imunológica permanecem no organismo (NOON; AROIAN, 2017).

Outro fator que se deve levar em consideração é que nesse estudo foram utilizados somente ratos machos. Ratos machos (Wistar) demonstraram ser mais suscetíveis contra infecção por *S. venezuelensis* do que as fêmeas. Os hormônios sexuais masculinos (testosterona) e femininos (estrógeno) são importantes na regulação para abaixar ou aumentar a resistência do hospedeiro contra a *S. venezuelensis* em ratos Wistar (RIVERO et al., 2002a). A idade dos animais é outro fator a ser considerado, uma vez que quanto mais velho o animal, ele se torna menos susceptível a infecção por *S. venezuelensis* (RIVERO et al., 2002b).

Ao comparar os títulos de IgG produzidos pode-se perceber que os grupos imunizados com alúmen demonstraram maior títulos de anticorpos. Os compostos de alumínio são bem

conhecidos por induz aumento dos títulos de IgG com uma imunidade relativamente duradoura, de fácil formulação e um longo histórico de segurança vacinal (BURAKOVA et al., 2018).

Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação de cada um dos compostos vacinais. A aplicação dessas formulações vacinais em animais imunossuprimidos seria muito importante para avaliar como esses animais responderiam frente as formulações. Outro estudo com imunização com peptídeos sintéticos seria uma solução para avaliar o real desempenho dos peptídeos C9 e C10 expressos em fagos, uma vez, que a imunização com fagos selvagens também reduziu a carga parasitária de *S. venezuelensis*.

6 – CONCLUSÕES

- A técnica de *phage display* foi eficiente na seleção de clones específicos contra ao peptídeo sintético C10.
- Os fagos C4 e G8 ligantes ao peptídeo sintético C10 podem detectar imunocomplexo específicos na estrogiloidíase humana com boa sensibilidade e especificidade.
- Os clones C4 e G8 reconhecem antígenos de *S. venezuelensis*.
- A imunização com fagos expressando tanto o peptídeo C9 quanto C10 com ambos adjuvantes foram eficientes na redução da carga parasitaria de *S. venezuelensis*.
- Os ratos imunizados com fagos expressando os peptídeos C9 e C10 aumentaram a produção de IgG antes da infecção desafio.
- Os peptídeos miméticos de antígenos de *S. venezuelensis* podem ser utilizados como nova ferramenta no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana e no desenvolvimento de vacinas em modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.030>
- AGHEBATI-MALEKI, L.; BAKHSHINEJAD, B.; BARADARAN, B.; MOTALLEBNEZHAD, M.; AGHEBATI-MALEKI, A.; NICKHO, H.; YOUSEFI, M.; MAJIDI, J. Phage display as a promising approach for vaccine development. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, p. 1-18, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>
- AGUILAR, J.C.; RODRÍGUEZ, E.G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, p. 3752-3762, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.111>
- AHMAD, S.; MOINUDDIN, A. A. Immunological studies on glycated human IgG. **Life Sciences**, v. 26, p. 980-987, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.002>
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Parasite antigen-specific regulation of Th1, Th2, and Th17 responses in *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 195, p. 2241-2250, 2015. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500745>
- ARAP, M. C. Phage display technology - applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p.1-9, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100001>
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BAKSHINEJAD, B.; ZADE, H.M.; SHEKARABI, H.S.; NEMAN, S. Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. **Amino Acids**, v. 48, p. 2699-2716, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2329-6>
- BARBAS, C.F. III; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. **Phage display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. p.738.
- BAVA, A. J. B.; DOMÍNGUEZ, C.; TRONCOSO, A. Adult female of *Strongyloides stercoralis* in respiratory secretions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 311-313, 2013. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60069-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60069-6)
- BECKER, S.L.; SIETO, B.; SILUÉ, K.D.; ADJOSSAN, L.; KONE, S.; HATZ, C.; KERN, W.V.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J. Diagnosis, clinical features, and self-reported morbidity of *Strongyloides stercoralis* and hookworm infection in a co-endemic setting. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, p.1-8, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001292>
- BEKNAZAROVA, M.; WHILEY, H.; ROSS, K. Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p.1-15, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13050517>

BICALHO, K.A.; ARAÚJO, F.T.M.; ROCHA, R.S.; CARVALHO, O.S. Sanitary profile in mice and rats colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - Endo and ectoparasites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1478-1484, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600020>

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A.J.; GOTUZZO, E.; MENA, M.A.; CHIODINI, P.L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p.1-4, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>

BOSQUI, L.R.; GONÇALVES, A.L.R.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; PAVANELLI, W.R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J.M.; COSTA, I.N. Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.14, p. 1-5, 2017.

BOWMAN, D.D. **Georgir's Parasitology for Veterinarians**. 10^a ed. Philadelphia: Elsevier, 2014, pp. 330–331.

BRELOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology**, v. 144, p. 295-315, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000111>

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**. 6th ed, Paris: Masson et Cie, p. 1.042, 1947.

BUONFRATE, D.; FORMENTI, F.; PERANDIN, F.; BISOFFI, Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, p. 543-552, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.001>

BUONFRATE, D.; REQUENA-MENDEZ, A.; ANGHEBEN, A.; CINQUINI, M.; CRUCIANI, M.; FITTIPALDO, A.; GIORLI, G.; GOBBI, F.; PIUBELLI, C.; BISOFFI, Z. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection- A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. 1-16, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006229>

BURAKOVA, Y.; MADERA, R.; MCVEY, S.; SCHLUP, J.R.; SHI, J. Adjuvants for animal vaccines. **Viral Immunology**, v. 31, p. 11-22, 2018. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>

COLES, G.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; GEERTS, S.; KLEI, T.; TAYLOR, M.; WALLER, P. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)

CORTÉS, A.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.G.; TOLEDO, R. Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 678-693, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.004>

COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; ALMEIDA-VITOR, R.W. **Parasitologia humana**, 13^a ed., Rio de Janeiro: Atheneu, p.313-323, 2016.

COSTA-CRUZ, J.M.; BULLAMAH, C.B.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; CAMPOS, D.M.B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329–331, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651998000500013>

CUNHA, R.A.; CARVALHO, E.F.G.; SOUSA, J.E.N.; COSTA-CRUZ, J.M. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. **Parasitology International**, v. 66, p. 671-676, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.07.001>

DABROWSKA, K.; SWITAŁA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 7-13, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x>

DE BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteróide. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 247-250, 2008.

DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; DIDIERLAURENT, A.M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. **Seminars in Immunology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>

FACCIOLI, L. H.; MEDEIROS, A. L.; MALHEIRO, A.; PIETRO, R. C.; JANUÁRIO, A.; VARGAFTIG, B. B. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 7, p.41-47, 1998. <https://doi.org/10.1080/09629359891379>

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. do R.; GONÇALVES, A. L.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.01.012>

FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. DA S.; SANTOS, F. DE 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, p. 1-9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002792>

FELICIANO, N.D., RIBEIRO, V.S., GONZAGA, H.T., SANTOS, F.A., FUJIMURA, P.T., GOULART, L.R., COSTA-CRUZ, J.M. 2016. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology Letters**, v.172, p. 89-93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.002>

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; SOUZA, R. S. de; COELHO, F. M. C.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Role of IL-13 in a model of *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 12, p.409-414, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.01.012>

GALÁN, A.; COMOR, L.; HORVATIC, A.; KULEŠ, J.; GUILLEMIN, N.; MRLJAK, V.; BHIDE, M. Library-based display technologies: where do we stand? **Molecular BioSystems**, v.12, p. 2342-2358, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6MB00219F>

GELDHOF, P.; VERCAUTEREN, I.; VERCRUYSSSE, J.; KNOX, D.P.; VAN DEN BROECK, W.; CLAEREBOUT, E. Validation of the protective *Ostertagia ostertagi* ES-thiol antigens with different adjuvantia. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 37-43, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00681.x>

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 345-355, 1992. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.345>

GONÇALVES, A. L.; RIBEIRO, T. S.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A novel approach based on antigen, antibody and immune complex detection in bronchoalveolar lavage fluid samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica**, v. 124, p. 166-69, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.010>

GONÇALVES, A.L., ARAÚJO, K.C., CARVALHO, E.F., UETA, M.T., COSTA-CRUZ, J.M. Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. **Journal of Helminthology**, v.90, p. 342-346, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000346>

GONZAGA, H.T.; RIBEIRO, V.da.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, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.016>

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

GOULART, L.R.; SANTOS, P.de.S. Strategies for vaccine design using phage display-derived peptides. **Methods in Molecular Biology**, v. 1404, p. 423-435, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1_28

GOULART, L.R; RIBEIRO, V.daS.; COSTA-CRUZ, J.M. Anti-parasitic antibodies from phage display. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1053, p. 155-171, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_8

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

GUASCONI, L.; SERRADELL, M.C.; BORGONOVO, J.; GARRO, A.P.; VARENGO, H.; CAFFE, G.; MASIH, D.T. Immunization with crude antigens plus aluminium hydroxide protects cattle from *Fasciola hepatica* infection. **Journal of Helminthology**, v. 82, p. 64-69, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)

HAIRUL BAHARA, N.H.; TYE, G.J.; CHOONG, Y.S.; ONG, E.B.; ISMAIL, A.; LIM, T.S. Phage display antibodies for diagnostic applications. **Biologicals**, v. 41, p. 209-216, 2013.

- HALL, A.; CONWAY, D.J.; ANWAR, K.S.; RAHMAN, M.L. *Strongyloides stercoralis* in an urban slum community in Bangladesh: factors independently associated with infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Royal Society of Tropical**, v. 88, p. 527-530, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000022>
- HENRIQUEZ-CAMACHO, C.; GOTUZZO, E.; ECHEVARRIA, J.; WHITE, A.C. JR.; TERASHIMA, A.; SAMALVIDES, F.; PÉREZ-MOLINA, J.A.; PLANA, M.N. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, p. 1-53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.04.001>
- HENRY, K.A.; ARBABI-GHAHROUDI, M.; SCOTT, J.K. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. **Frontiers in Microbiology**, v.4, p. 1-18, 2015. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90146-5)
- HEWITSON, J.P.; MAIZELS, R.M. Vaccination against helminth parasite infections. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, p. 473-487, 2014. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.893195>
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis Mansoni. **J. International Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 9, p. 283-291, 1934.
- JOURDAN, P.M.; LAMBERTON, P.H.L.; FENWICK, A.; ADDISS, D.G. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, p. 252-265, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)
- KIM, J.H.; KIM, D.S.; YOON, Y.K.; SOHN, J.W.; KIM, M.J. Donor-derived strongyloidiasis infection in solid organ transplant recipients: a review and pooled analysis. **Transplantation Proceedings**, v. 48, p. 2442-2449, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.11.045>
- KROLEWIECKI, A. J.; LAMMIE, P.; JACOBSON, J.; GABRIELLI, A. F.; LEVECKE, B.; SOCIAS, E.; ARIAS, L. M.; SOSA, N.; ABRAHAM, D.; CIMINO, R.; ECHAZÚ, A.; CRUDO, F.; VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-7, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002165>
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LAMPE, K.; GOTTSTEIN, B.; BECKER, T.; STAHL-HENNIG, C.; KAUP, F.J.; MÄTZ-RENSING, K. Immunization of rhesus macaques with *Echinococcus multilocularis* recombinant 14-3-3 antigen leads to specific antibody response. **Parasitology Research**, v.116, p.435-439, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5303-z>
- LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.015>

- LEVENHAGEN, M.A.; CONTE, H.; COSTA-CRUZ, J.M. Current progress toward vaccine and passive immunization approaches for *Strongyloides* spp. **Immunology Letters**, v.180, p.17-23, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.005>
- LEVENHAGEN, M.A.; ALMEIDA ARAÚJO, S. F.; FUJIMURA, P.T.; CARNEIRO, A.P.; COSTA-CRUZ, J.M.; GOULART, L.R. Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of *Strongyloides* sp. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep10447>
- LÓPEZ R.L.; GRANDE BURGOS, M.J.; GÁLVEZ, A.; PÉREZ PULIDO, R. The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. **APMIS**, v.125, p. 3-10, 2017. <https://doi.org/10.1111/apm.12609>
- 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.V. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-125, 1919. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761919000100006>
- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES M. DO R. F.; ALVES DE OLIVEIRA, J. B.; 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. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600024>
- MARCIANI, D.J. Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.39, p. 573-585, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.005>
- MARQUES, P.D.; MALTA, F.M.; MEISEL, D.M.; CORRAL, M.A.; PINHO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHER, R.C.; PAULA, F.M. Diagnosis of the strongyloid nematode *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected rats. **Journal of Helminthology**, v. 90, p. 422-427, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000528>
- MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in lewis rats: comparison of histological analyses and PCR. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 334-339, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.006>
- MARTINEZ-PEREZ, A.; ROURE DÍEZ, S.; BELHASSEN-GARCIA, M.; TORRÚS-TENDERO, D.; PEREZ-ARELLANO, J.L.; CABEZAS, T.; SOLER, C.; DÍAZ-MENÉNDEZ, M.; NAVARRO, M.; TREVIÑO, B.; SALVADOR, F. Management of severe strongyloidiasis attended at reference centers in Spain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006272>
- McWILLIAM, H.E.G.; DRIGUEZ, P.; PIEDRAFITA, D.; MCMANUS, D.P.; MEEUSEN, E.N.T. Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 276-284, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01330.x>

MEJIA, R.; NUTMAN, T. B. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 458-463, 2012. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>

MENÉNDEZ, M.; NAVARRO, M.; TREVIÑO, B.; SALVADOR, F. Management of severe strongyloidiasis attended at reference centers in Spain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, p. 1-12, 2018.

MINEO, J. R. **Pesquisa na área Biomédica: do planejamento a publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. p. 273.

MOBLEY, C.M.; DHALA, A.; GHOBRIAL, R.M. *Strongyloides stercoralis* in solid organ transplantation: early diagnosis gets the worm. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 22, p. 336-344, 2017. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000428>

MIRZAEI, M.K.; MAURICE, C.F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 397-408, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>

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

MOTRAN, C.C.; SILVANE, L.; CHIAPELLO, L.S.; THEUMER, M.G.; AMBROSIO, L.F.; VOLPINI, X.; CELIAS, D.P.; CERVI, L. Helminth infections: recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00664>

NAVARRO, F.; MUNIESA, M. Phages in the human body. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; ALMEIDA-VITOR, R.W. **Parasitologia humana**, 13ª ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. p. 555-559.

NOON, J.B.; AROIAN, R.V. Recombinant subunit vaccines for soil-transmitted helminths. **Parasitology**, v.144, p. 1845-1870, 2017. <https://doi.org/10.1017/S003118201700138X>

NORSYAHIDA, A.; RIAZI, M.; SADJJADI, S.M.; MUHAMMAD HAFIZNUR, Y.; LOW, H.C.; ZEEHAIDA, M.; NOORDIN, R. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. **Parasite Immunology**, v. 35, p. 174-179, 2013. <https://doi.org/10.1111/pim.12029>

NUTMAN, T.B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, v. 144, p. 263-273, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>

OLESZYCKA, E.; LAVELLE, E.C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. **Current Opinion in Immunology**, v.28, p. 1-5, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.007>

OSTERA, G.; BLUM, J. Strongyloidiasis: risk and healthcare access for Latin American immigrants living in the United States. **Current Tropical Medicine Reports**, v.3, p. 1-3, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0065-3>

PACHECO-TENZA, M.I.; RUIZ-MACIÁ, J.A.; NAVARRO-COTS, M.; GREGORI-COLOMÉ, J.; CEPEDA-RODRIGO, J.M.; LLENAS-GARCÍA, J. *Strongyloides stercoralis* infection in a Spanish regional hospital: not just an imported disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, p. 24-28, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.08.007>

PACÍFICO, L.G.; FONSECA, C.T.; BARSANTE, M.M.; CARDOSO, L.S.; ARAÚJO, M.I.; OLIVEIRA, S.C. Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 365-368, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900060>

PAGE, W.; JUDD, J.A.; BRADBURY, R.S.B. The unique life cycle of *Strongyloides stercoralis* and implications for public health action. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 3, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020053>

PANDE, J.; SZEWCZYK, M.M.; GROVER, A.K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 849-858, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

PASCHKE, M. Phage display systems and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 2-11, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0270-9>

PAULA, F.M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, p. 1331-1340, 2011. <https://doi.org/10.1017/S003118201100120X>

PAULA, F.M.; MALTA, F.DEM.; MARQUES, P.D.; SITTA, R.B.; PINHO, J.R.; GRYSCHKE, R.C.; CHIEFFI, P.P. Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, p.272-274, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140371>

POCATERRA, L.A.; FERRARA, G.; PEÑARANDA, R.; ROJAS, E.; PÉREZ-CHACÓN, G.; HERNÁN, A.; CERTAD, G.; GOLDSTEIN, C.; NÚÑEZ, L. Improved detection of *Strongyloides stercoralis* in modified agar plate cultures. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 863-865, 2017. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0414>

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, p. 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>

RAJAMANICKAM, A.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; DOLLA, C.K.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Elevated systemic levels of eosinophil, neutrophil, and mast cell granular proteins in *Strongyloides stercoralis* infection that diminish following treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00207>

- RAJPUT, Z.I.; HU, S.H.; XIAO, C.W.; ARIJO, A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 8, p. 153-161, 2007. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0153>
- RAMANATHAN, R.; BURBELO, P.D.; GROOT, S.; IADAROLA, M.J.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 444-451, 2008. <https://doi.org/10.1086/589718>
- REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 23-32, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
- REIS, C.F.; CARNEIRO, A.P.; VIEIRA, C.U.; FUJIMURA, P.T.; MORARI, E.C.; SILVA, S.J.; GOULART, L.R.; WARD, L.S. An antibody-like peptide that recognizes malignancy among thyroid nodules. **Cancer Letters**, v. 335, p. 306-313, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.039>
- REITZ, M.; HARTMANN, W.; RÜDIGER, N.; ORINSKA, Z.; BRUNN, M.L.; BRELOER, M. Interleukin-9 promotes early mast cell-mediated expulsion of *Strongyloides ratti* but is dispensable for generation of protective memory. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26907-2>
- REPETTO, S.A.; RUYBAL, P.; SOLANA, M.E.; LÓPEZ, C.; BERINI, C.A.; ALBA SOTO, C.D.; CAPPA, S.M. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. **Acta Tropica**, v.157, p.169-177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.004>
- RIBEIRO, S. R.; FURST, C. Parasitological stool sample exam by spontaneous sedimentation method using conical tubes: effectiveness, practice, and biosafety. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 399-401, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000300024>
- RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; NETO, V. A. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 648-653, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600017>
- RIVERO, J.C.; INOUE, Y.; MURAKAMI, N.; HORII, Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 457-461, 2002a. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.457>
- RIVERO, J.C.; INOUE, Y.; MURAKAMI, N.; HORII, Y. Age- and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to *Strongyloides venezuelensis* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 519-521, 2002b. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.519>
- ROXBY, A.C.; GOTTLIEB, G.S.; LIMAYE, A.P. Strongyloidiasis in transplant patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1411-1423, 2009. <https://doi.org/10.1086/630201>

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

SALLES, B.C.; COSTA, L.E.; ALVES, P.T.; DIAS, A.C.; VAZ, E.R.; MENEZES-SOUZA, D.; RAMOS, F.F.; DUARTE, M.C.; ROATT, B.M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; TAVARES, C.A.; GONÇALVES, D.U.; ROCHA, R.L.; GOULART, L.R.; COELHO, E.A. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, p. 219-225, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.012>

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 57-62, 1990. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90173-K)

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. 7, p. 1-17, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

SILVA, D. A.O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p.181-195, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00132-2)

SILVA, V.R.; MANHANI, M.N.; CARDOSO, R.; VIEIRA, C.U.; GOULART, L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v.129, p. 94-99, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.01.008>

SITTA, R.B.; MALTA, F.M.; PINHO, J.R.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C.; PAULA, F.M. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.141, p. 716-721, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002035>

SOPELETE, M.C. Métodos de análise em estudos sobre diagnóstico. In: MINEO, J. R. **Pesquisa na área Biomédica: do planejamento a publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. pp.203-223.

SOUSA, J.E.; CARVALHO, E.F.G.; LEVENHAGEN, M.A.; FARIA, L.S.; GONÇALVES-PIRES, M.DO.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Serological cross-reactivity between *Strongyloides venezuelensis* and *Syphacia muris* in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **Parasitology International**, v. 65, p.137-145, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.11.005>

SUN, H.X.; XIE, Y.; YE, Y.P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, p. 1787-1796, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>

TAN, Y.; TIAN, T.; LIU, W; ZHU, Z.J.; YANG, C. Advance in phage display technology for bioanalysis. **Biotechnology Journal**, v. 11, p.732-745, 2016. <https://doi.org/10.1002/biot.201500458>

TANIDEH, N.; SADJJADI, S.M.; MOHAMMADZADEH, T.; MEHRABANI, D. Helminthic infections of laboratory animals in animal house of Shiraz University of Medical Sciences and the potential risks of zoonotic infections for researchers. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.12, p. 151-157, 2010.

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.G. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 165-241, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.005>

VERWEIJ, J. J.; CANALESB, M.; POLMANC, K.; ZIEMD, J.; BRIENENA, E. A. T.; POLDERMANA, A. M.; LIESHOUTA, L. V. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p.342-346, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>

VILLA-MANCERA, A.; REYNOSO-PALOMAR, A.; UTRERA-QUINTANA, F.; CARREÓN-LUNA, L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. **Parasitology Research**, v.113, p. 243-250, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3650-6>

VIJAYAN, V. K. Parasitic lung infections. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.15, p. 274–282, 2009. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328326f3f8>

VINEY, M.E.; LOK, J.B. The biology of *Strongyloides* spp. 2015. **Wormbook: the C. elegans Research Community**. Disponível em: <http://www.wormbook.org>.

VLAMINCK, J.; LÓPEZ-ABÁN, J.; RUANO, A.L.; DEL OLMO, E.; MURO, A. Vaccination against *Strongyloides venezuelensis* with homologue antigens using new immunomodulators. **Journal of Parasitology**, v. 96, p.643-647, 2010. <https://doi.org/10.1645/GE-2276.1>

WEATHERHEAD, J.; 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. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0032-9>

WOLL, F.; GOTUZZO, E.; MONTES, M. *Strongyloides stercoralis* infection complicating the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 229-234, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00017-0>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: http://www.who.int/intestinal_worms/disease/en/. Acesso em 10 de julho de 2018.

WU, C.H.; LIU, I.J.; LU, R.M.; WU, H.C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, v.19, p. 23-28, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0223-x>

WU, T.C.; LEI, W. Y. L.; CHENA, M.-C.; HUA, C.-T. *Strongyloides stercoralis* infection: a health issue regarding indigenous people in Taiwan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 468–472, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.04.004>

YASUDA, K.; NAKANISHI, K. Host responses to intestinal nematodes. **International Immunology**, v. 30, p. 93-102, 2018. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy002>

YOO, S.Y.; MERZLYAK, A.; LEE, S.W. Synthetic phage for tissue regeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-11, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/192790>