

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

**PRODUTOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE *Strongyloides venezuelensis*:
APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE E
CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREATIVAS**

EDSON FERNANDO GOULART DE CARVALHO

Uberlândia – MG
Fevereiro/2019

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

**PRODUTOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE *Strongyloides venezuelensis*:
APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE E
CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREATIVAS**

Tese submetida ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas.

Edson Fernando Goulart de Carvalho

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

Uberlândia – MG
Fevereiro/2019



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Edson Fernando Goulart de Carvalho

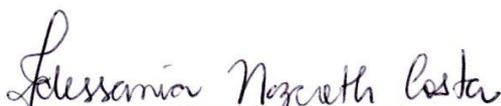
“Produtos de excreção/secreção de *Strongyloides venezuelensis*: aplicação ao diagnóstico da estrogiloidíase e caracterização de proteínas imunorreativas”

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:

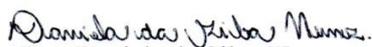
Uberlândia, 18 de fevereiro de 2019.


Prof. Dra. Idessania Nazareth da Costa

UEL


Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga

PMU


Dra. Daniela da Silva Nunes

UFU


Dra. Juliana Silva Miranda

ICBIM/UFU


Prof. Dra. Julia Maria Costa Cruz – (orientadora)
ICBIM/UFU

www.imunoparasito.ufu.br - E-mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034) 3225-8672
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C331 2019	<p>Carvalho, Edson Fernando Goulart de, 1980- PRODUTOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE <i>Strongyloides venezuelensis</i>: APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREATIVAS [recurso eletrônico] / Edson Fernando Goulart de Carvalho. - 2019.</p> <p>Orientadora: Julia Maria Costa Cruz. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2384 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. Costa Cruz, Julia Maria, 1956-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

“A arte de ser feliz

Houve um tempo em que minha janela se abria
sobre uma cidade que parecia ser feita de giz.
Perto da janela havia um pequeno jardim quase seco.
Era uma época de estiagem, de terra esfarelada,
e o jardim parecia morto.
Mas todas as manhãs vinha um pobre com um balde,
e, em silêncio, ia atirando com a mão umas gotas de água sobre as plantas.
Não era uma rega: era uma espécie de aspersão ritual, para que o jardim não morresse.
E eu olhava para as plantas, para o homem, para as gotas de água que caíam de seus dedos
magros e meu coração ficava completamente feliz.
Às vezes abro a janela e encontro o jasmineiro em flor.
Outras vezes encontro nuvens espessas.
Avisto crianças que vão para a escola.
Pardais que pulam pelo muro.
Gatos que abrem e fecham os olhos, sonhando com pardais.
Borboletas brancas, duas a duas, como refletidas no espelho do ar.
Marimbondos que sempre me parecem personagens de Lope de Vega.
Às vezes, um galo canta.
Às vezes, um avião passa.
Tudo está certo, no seu lugar, cumprindo o seu destino.
E eu me sinto completamente feliz.
Mas, quando falo dessas pequenas felicidades certas,
que estão diante de cada janela, uns dizem que essas coisas não existem,
outros que só existem diante das minhas janelas, e outros,
finalmente, que é preciso aprender a olhar, para poder vê-las assim.”

Cecília Meireles

Dedicatória

Dedico essa vitória à minha mãe Maria Cristina Goulart de Carvalho, ao meu companheiro Noriel Viana Pereira e a todos os meus Professores.

Agradecimentos

Agradeço a *Deus*, por me conduzir no caminho do saber e da bondade.

Agradeço a minha mãe Maria Cristina, ao meu companheiro Noriel e aos meus familiares, pelo amor, carinho e incentivo. Por estarem de mãos dadas comigo, desde quando iniciei a vida acadêmica, e por entenderem minhas dificuldades, defeitos, erros e, mesmo assim, me tratarem como motivo de orgulho. Amo muito vocês.

Aos meus amigos por trazerem momentos de alegria e de fervorosas risadas, aliviando meu cansaço.

À professora Dr^a. Julia Maria Costa Cruz pelos anos de convivência, confiança, saberes e oportunidades a mim dedicados, sou muito grato por toda a experiência adquirida estando ao seu lado.

A equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, em especial ao José Eduardo, Luisa, Bruna, Gabriela, Camila, Guilherme, Ana Paula, Daniela, Lucas, Henrique e Vanessa, pelas palavras de incentivo, amizade e companheirismo. Por partilharmos momentos de muita alegria, dentro e fora do laboratório, aliviando momentos de tensão que a vida acadêmica e pessoal acabam por nos pôr a prova. Acreditem, vocês foram fundamentais nessa minha caminhada.

Aos Técnicos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses em especial a Dr^a Vanessa da Silva Ribeiro e a Dr^a Juliana Silva Miranda, pela prestatividade, auxílio em momentos de dificuldade, pela experiência compartilhada, palavras de conforto e amizade.

Agradeço aos animais de experimentação, aqueles cuja existência nos permite avanços na ciência e no tratamento de doenças, em especial aos ratos vistos pela sociedade com maus olhos, mas que não imagina a quantidade de descobertas, inovações, tratamentos e benefícios que esses animais nos proporcionam, nos bastidores da ciência.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente desta minha conquista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Morfologia e ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	13
1.2. Epidemiologia da estrogiloidíase.....	17
1.3. Aspectos clínicos da estrogiloidíase.....	19
1.4. Resposta imune do hospedeiro.....	20
1.5. Imunossupressão na estrogiloidíase.....	22
1.6. Modelo experimental na estrogiloidíase.....	23
1.7. Antígenos de excreção e secreção.....	25
1.8. Diagnóstico da estrogiloidíase.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Aspectos éticos.....	32
3.2. Animais.....	32
3.3. Amostras de soro humano.....	33
3.4. Imunossupressão experimental com fosfato de dexametasona.....	34
3.5. Obtenção de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	34
3.6. Produção do extrato Total Salino (TS) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> ..	35
3.7. Infecção experimental e obtenção de amostras de soro dos ratos.....	35
3.8. Produtos de Excreção/Secreção (E/S) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> ..	36
3.9. Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do extrato total salino e produtos de E/S de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	37
3.10. ELISA na detecção de anticorpos IgG anti- <i>S. venezuelensis</i> em amostras de soro de ratos infectados experimentalmente.....	38

3.11 ELISA na detecção de anticorpos IgG anti <i>S. stercoralis</i> em amostras de soro de humano.....	39
3.12. <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro humano	40
3.13. Espectrometria de massa e análise de bioinformática.....	41
3.13.1. Preparação de amostra para espectrometria de massa.....	41
3.13.2. Análise de espectrometria de massa.....	42
3.13.3. Peptídeo de sinal.....	43
3.13.4. Construção dos modelos tridimensionais proteicos.....	44
3.13.5. Predição de epítomos de células B.....	45
3.14. Análise estatística.....	45
3.15. Normas de biossegurança.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Perfil eletroforético do extrato total salino e produtos de excreção/secreção de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	47
4.2. Ovos por grama de fezes (OPG) e contagem de Fêmeas partenogénéticas (FP) dos ratos infectados com <i>S. venezuelensis</i>	48
4.3. Detecção de IgG anti- <i>S. venezuelensis</i> em amostras de soro de ratos infectados experimentalmente.....	48
4.4. Detecção de IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro humano.....	50
4.5. <i>Immunoblotting</i> com amostras de soro humano.....	53
4.6. Espectrometria de massas.....	55
4.7. Peptídeo sinal.....	59
4.8. Modelagem e análise dos modelos tridimensionais proteicos.....	61
4.9. Predição de epítomos de célula B.....	67
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Proteínas identificadas nas bandas de 17 kDA, por espectrometria de massas para o extrato total salino (TS) e os produtos de excreção/secreção (RPMI E/S e PBS E/S) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*, selecionadas por maior *score* e cobertura. 58
- Quadro 2.** Valores de *c-score* obtidos pela plataforma online *I-Tasser* na construção de modelos tridimensionais de proteínas. 61
- Quadro 3.** Resíduos previstos pelo programa computacional *Bipipred 2.0* das proteínas identificadas em preparados antigênicos de *Strongyloides venezuelensis*. 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros de diagnóstico para extrato total salino (TS), produtos de excreção/secreção em RPMI (RPMI E/S) ou PBS (PBS E/S) produzidos a partir de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. ELISA aplicado em amostras de soro de ratos infectados com *S. venezuelensis*. 50
- Tabela 2.** Parâmetros de diagnóstico para extrato total salino (TS), produtos de excreção/secreção em RPMI (RPMI E/S) ou PBS (PBS E/S) produzidos a partir de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. ELISA aplicado em amostras de soro humano. 52
- Tabela 3.** Percentual de validação da estrutura tridimensional obtidos pelo programa VERIFY3D 62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil eletroforético do extrato salino total e produtos de excreção/secreção de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. 47
- Figura 2.** Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e contagem de fêmeas partenogênicas (FP) dos ratos infectados com *S. venezuelensis*. 48
- Figura 3.** Detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS, produtos de E/S em RPMI e E/S EM PBS de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos 49
- Figura 4.** Detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS, produtos de E/S em RPMI e PBS de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro humano. 51
- Figura 5.** Comparação na detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS, produtos de E/S em RPMI e PBS de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro humano. 52
- Figura 6.** *Immunoblotting* para detecção de IgG utilizando extrato total salino - TS, produtos de E/S em RPMI e em PBS de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em *pool* de amostras de soro humano. 54
- Figura 7.** Gel de poliacrilamida com TS, RPMI E/S e PBS E/S corados por Coomassie coloidal. 55
- Figura 8.** Análise de peptídeo sinal das proteínas: A0A0K0FJA1 – proteína contendo domínio CAP, A0A0K0FHM6 – proteína ligante de cálcio - AT09395P, A0A0K0F4S7 – proteína contendo domínio CAP, A0A0K0FX99 – proteína contendo domínio CAP e A0A0K0F262 – proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina. 60
- Figura 9.** Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0FJA1 – proteína contendo domínio CAP - FAMÍLIA CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Protein*) - proteína identificada nas três preparações (TS, RPMI E/S E PBS E/S). 63
- Figura 10.** Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0FHM6 – AT09395P - proteína identificada no extrato total salino –TS. 64
- Figura 11.** Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0F4S7 – proteína contendo domínio CAP - FAMÍLIA CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Protein*) identificada no produto RPMI E/S. 65
- Figura 12.** Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0F262 – proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina identificada no produto PBS E/S. 66
- Figura 13.** Predição de epítomos de célula B lineares pelo software Bepipred 2.0 obtido pela plataforma Immune Epitope Database (IEDB) (<http://www.iedb.org/>). 69

RESUMO

A estrogiloidíase humana é uma parasitose intestinal causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* com distribuição mundial e predominância em áreas tropicais e subtropicais. O diagnóstico parasitológico apresenta baixa sensibilidade devido à intermitente eliminação de larvas nas fezes e por aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos serem assintomáticos. O diagnóstico sorológico, apesar de mais sensível, apresenta reatividade cruzada com outras parasitoses. A busca por antígenos que apresentem bons padrões diagnósticos, se faz necessário, e o uso de modelos experimentais podem auxiliar na obtenção de antígenos heterólogos aplicáveis ao diagnóstico. *Strongyloides venezuelensis* é frequentemente utilizado para avaliar a interação parasito-hospedeiro, os aspectos moleculares durante a infecção, a eficácia de novas terapias e outras características imunológicas da estrogiloidíase. O uso de produtos de excreção/secreção (E/S) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* no diagnóstico da estrogiloidíase, apresenta-se como uma ferramenta promissora. O objetivo da pesquisa foi obter produtos de E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, aplicá-los no diagnóstico da estrogiloidíase e identificar e caracterizar parcialmente as proteínas imunorreativas. Testes ELISA para detecção de IgG anti-*Strongyloides* foram realizados, com amostras de soro de ratos experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* ou de soro humano, utilizando extrato total salino (TS) e produtos E/S (RPMI E/S e PBS E/S). *Immunoblotting* foi realizado para detectar as frações proteicas imunorreativas, e posteriormente foram analisadas por espectrometria de massas e bioinformática. Todas as preparações detectaram IgG anti-*Strongyloides* com destaque para o RPMI E/S (Se = 83,3% e Es = 100%), na análise com soro de rato e PBS E/S (Se = 81,7% e Es = 88,9%) em amostras de soro humano. No *immunoblotting* foram identificadas bandas proteicas específicas com aproximadamente 17 kDa nas três preparações. Na análise de bioinformática, foram identificadas proteínas contendo domínio CAP pertencente a superfamília CRISP (A0A0K0FJA1) nas três preparações, no TS uma proteína ligante de cálcio, RPMI E/S duas proteínas contendo domínio CAP e PBS E/S uma proteína não caracterizada da família ADF/Cofilin. Em sua maioria as proteínas identificadas são produtos de E/S, apresentando sequências preditas como epítomos de célula B. Conclui-se que os produtos de E/S apresentaram desempenho diagnóstico superior ao TS, tanto na estrogiloidíase experimental quanto humana. Bandas proteicas de 17 kDa específicas para *Strongyloides*, apresentaram em sua composição, proteínas contendo domínio CAP. A construção dos modelos tridimensionais das proteínas e suas validações foram satisfatórias e permitiram entender como essas proteínas apresentam sua conformação. A predição de epítomos de célula B, pelo programa Bepipred 2.0, identificou sequências como epítomos de célula B, podendo serem utilizadas como possíveis ferramentas diagnósticas, como também em testes vacinais.

Palavras-chave: estrogiloidíase, excreção/secreção, imunodiagnóstico, proteínas contendo domínio CAP, superfamília CRISP.

ABSTRACT

Strongyloides venezuelensis EXCRETORY/SECRETORY PRODUCTS: APPLICATION TO STRONGYLOIDIASIS DIAGNOSIS AND CHARACTERIZATION OF IMMUNOREACTIVE PROTEINS.

The Human strongyloidiasis is an intestinal parasitosis caused by the nematode *Strongyloides stercoralis* with worldwide distribution and predominance in tropical and subtropical areas. Parasitological diagnosis presents low sensitivity due to intermittent elimination of larvae in the faeces and approximately 50% of the affected individuals are asymptomatic. In the serological diagnosis, although more sensitive, cross reactivity still occurs with other parasitoses. The search for antigens that present greater specificity, if necessary, and the use of experimental models may aid in the production of heterologous antigens. *Strongyloides venezuelensis* is often used to evaluate host-parasite interaction, molecular aspects during infection, efficacy of new therapies, and other immunological characteristics of strongyloidiasis. Thus, use of excretory/secretory products (E/S) of filaroid larvae of *S. venezuelensis* in the diagnosis of strongyloidiasis presents itself as a promising tool. The objective of the research was to obtain E/S products of filaroid larvae of *S. venezuelensis*, apply them in the diagnosis of strongyloidiasis and to identify and partially characterize the immunoreactive proteins. ELISA tests for anti-*Strongyloid* IgG were carried out using samples of rat serum experimentally infected with *S. venezuelensis* or human serum using total saline extract (TS) and E/S products (RPMI E/S and PBS E/S). Immunoblotting was performed to detect the immunoreactive protein fractions and were later analyzed by mass spectrometry and bioinformatics. All preparations detected anti-*Strongyloides* IgG with emphasis on RPMI E/S (Se = 83.3% and Sp = 100%) on analysis with mouse serum and PBS E/S (Se = 81.7% and Sp = 88.9%) in human serum samples. In immunoblotting, specific protein bands with approximately 17 kDa were identified in the three preparations. In the bioinformatics analysis, proteins containing CAP domain belonging to the superfamily CRISP (A0A0K0FJA1) were identified in the three preparations, in TS a calcium binding protein, RPMI E/S two proteins containing CAP domain and PBS E/S an uncharacterized protein of the family ADF/Cofilin. Most of the identified proteins are E/S products, presenting predicted sequences as B cell epitopes. The E/S products presented superior diagnostic performance to TS, both in experimental and human strongyloidiasis. Protein bands of 17 kDa specific for *Strongyloides*, presented in their composition, proteins containing CAP domain. The construction of the three-dimensional models of the proteins and their validations were satisfactory and allowed to understand how these proteins present their conformation. Prediction of B-cell epitopes by the Bepipred 2.0 program identified sequences as B-cell epitopes and could be used as possible diagnostic tools as well as in vaccine trials.

Key words: strongyloidiasis, excretion/secretion, immunodiagnostic, proteins containing CAP domain, superfamily CRISP.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfologia e ciclo biológico de *S. stercoralis*

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, superfamília Strongyloidoidea, família Strongyloididae, que é composta por parasitos de interesse médico e veterinário (NCBI:txid6248, 2019). Apresenta mais de 52 espécies que podem ocorrer em aves, répteis, anfíbios e mamíferos domésticos e silvestres (GROVE, 1996).

Das diferentes espécies, apenas duas acometem o homem: *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni* (LEVINE, 1980; SCHÄR et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016). *S. stercoralis* tem distribuição cosmopolita em regiões tropicais e subtropicais (VINEY; LOK, 2015). *S. fuelleborni* ocorre em primatas africanos, onde a infecção pode ser compartilhada com humanos (PAMPIGLIONE; RICCIARDI, 1972; HIRA; PATEL, 1980). *S. fuelleborni kellyi* ocorre exclusivamente em humanos na Nova Guiné (ASHFORD; BARNISH, 1989; ASHFORD; BARNISH; VINEY, 1992; VINEY; LOK, 2015).

O parasito foi identificado em 1876 em soldados franceses que retornavam de serviço militar na Conchinchina, (atual Vietnã), por Louis A. Normand e descrito pelo Professor Arthur René Jean Baptiste Bavay, nomeados primeiramente como *Anguillula intestinalis*, por isso a denominação de anguilulose para a doença ocasionada por esse helminto (BAVAY, 1876; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016; VINEY, 2017).

A demonstração de que no ciclo de vida desse parasito ocorre uma fase estercoral constituída por parasitos de vida livre e outra fase intestinal representada pela fêmea parasita originou a denominação *S. stercoralis*, Stiles e Hassall, 1902. (“Strongylus” = arredondado; “oides” = semelhantes; “stercus” = esterco) (GROVE, 1996). Ribeiro da Luz reportou pela

primeira vez, em 1880, no Estado do Rio de Janeiro, a importância de *S. stercoralis* como agente etiológico da estrogiloidíase no Brasil, posteriormente, em 1948, Moraes enfatizou a importância médico-sanitária dessa parasitose (MORAES, 1948; MAIA et al., 2006; COSTA-CRUZ, 2016).

S. stercoralis apresenta seis formas evolutivas: fêmeas partenogênicas (FP), ovos, larvas rabdoídes, fêmeas de vida livre, machos de vida livre e larva filarioide, todas morfologicamente distintas (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2016). A FP adulta mede 1,7 a 2,5 mm de comprimento e 35 a 45 mm de diâmetro, apresentando porção anterior afilada e posterior curta e romba. Ao longo do corpo apresenta cutícula fina, semi-transparente e estriada transversalmente em toda a extensão. Em posição ventral no terço médio do corpo encontra-se a vulva, contendo dois lábios distintos e pouco proeminentes. Possui aparelho digestório simples, com boca hexagonal provida de lábios inconspícuos cercados por seis papilas com vestíbulo curto. O esôfago alongado, filariforme, cilíndrico, com pequena dilatação anterior, mede de um terço a um quarto do comprimento do helminto. O ânus localiza-se transversalmente, próximo à extremidade posterior. Apresenta dois canais excretores longitudinais, localizados ao longo do parasito, conectados um ao outro e a uma única célula excretora, por um ducto transversal, imediatamente atrás do anel nervoso. O sistema reprodutor em posição anfídelfa ocupa quase a totalidade dos dois terços posteriores do parasito. O útero apresenta número reduzido de ovos em geral de seis a nove ovos com graus variáveis de maturação, estão dispostos seriadamente com ovidutos em continuação e na mesma orientação dos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996). Os ovos formados por partenogênese pela FP, no princípio têm uma única célula (metâmera) a qual se divide progressivamente até formar mórula e depois embrião (MORAES, 1948; HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY, 1987).

A fêmea de vida livre ou estercoral, menor que a FP, é fusiforme e mede de 0,8 a 1,2 mm de comprimento e 50 mm de diâmetro, possui cutícula hialina, translúcida, delgada e

estriada transversalmente. A extremidade anterior é arredondada e a posterior afilada e pontiaguda. Provida de uma boca pequena, com lábios inconspícuos, seguida por curto vestíbulo. Esôfago curto, medindo entre a sétima e a oitava parte do comprimento total do corpo, dividido em três porções, uma anterior, cilíndrica e alongada, uma intermediária estreita e uma posterior globulosa (bulbo), aproximando-se do tipo rabdiforme. O ânus situado junto a uma papila próximo a extremidade posterior. Vulva situada próxima ao meio do corpo, com dois lábios conspícuos, proeminentes. Úteros em posição anfídelfa, ocupando grande parte do corpo do helminto, contendo até 28 ovos dispostos seriadamente em graus diversos de evolução. Oviduto está em continuação com os úteros, ligando-se aos ovários dobrados em orientação contrária aos respectivos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016).

O macho de vida livre apresenta corpo cilíndrico, estreitando-se para a extremidade anterior, que é arredondada e a posterior afila-se abruptamente, recurvando-se ventralmente terminando em ponta romba. Semelhante à fêmea de vida livre apresenta uma cutícula, lábios indistintos com esôfago ocupando a sexta ou sétima parte do comprimento do corpo. Os testículos ocupam grande extensão do corpo, contendo espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides, abrindo em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios, canaliculados curvos e medindo aproximadamente 38 mm, intimamente relacionados com o gubernáculo. Seis pares de papilas pré-cloacais desenvolvidas e um par de papilas cloacais de difícil observação (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

As larvas rabditoídes (L1 e L2) são as formas encontradas nas fezes ou nos fluídos intestinais. Tanto as da FP como as de vida livre são indistinguíveis, possuem a porção anterior fina e arredondada; extremidade posterior afilando-se gradualmente terminando em ponta com ápice rombo. Possui cutícula delgada e hialina, que apoia sobre uma camada granular, provavelmente de gordura. A boca é pequena, com vestíbulo curto e profundidade sempre menor que o diâmetro da larva, ao contrário do que se observa nas larvas de ancilostomatídeos,

em que o vestíbulo é alongado e sua profundidade igual ao diâmetro do corpo. Esôfago com dois bulbos, o anterior cilíndrico e alongado, o posterior globuloso e entre os dois uma porção estreitada, seu comprimento varia com o desenvolvimento da larva. Intestino com a porção anterior mais estreita. Ânus relativamente afastado da extremidade posterior. Primórdio genital desenvolvido e um pouco atrás do meio do corpo, formando um conjunto de células em número de seia a dezoito. Esse caráter é importante para sua diferenciação das larvas rabditóides dos ancilostomatídeos, em que o esboço genital é apenas vestigial (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016). A larva filarioide (L3) é a forma infectante capaz de penetrar a pele e as mucosas, sendo vista migrando pelos tecidos do hospedeiro. Dois tipos distintos de L3 são descritos, um que é de vida livre e outro presente nos casos de autoinfecção, diferem morfológicamente no tamanho e detalhes do esôfago, com o último sendo um pouco maior e mais destacado (GROVE, 1996).

Os ovos são depositados na mucosa intestinal nas glândulas de *Liebekühn*, sua forma é elíptica, parede fina e transparente, deixando perceber no momento da postura o embrião parcial ou inteiramente desenvolvido. Medindo de 50-58 μm e comprimento por 30-34 μm de diâmetro. Excepcionalmente, em indivíduos com o trânsito intestinal acelerado, pode-se observar nas fezes ovos do helminto já embrionados (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

O ciclo de vida de *S. stercoralis* é complexo quando comparado a outros nematódeos alternando entre ciclo de vida livre ou indireto e ciclo parasitário ou direto, não apresentando eliminação de ovos e sim de larvas rabditóides (L1 e L2) nas fezes (MORAES, 1948; GENTA, 1989; IRIEMENAM et al., 2010; VINEY, 2017). Uma vez penetrada à pele do indivíduo, a larva filarioide (L3) atinge a corrente sanguínea e linfática fazendo rota pelo coração e pulmões, onde se diferencia de larva L3 para L4. As larvas L4 atingem a árvore brônquica chegando à faringe, onde podem ser expelidas ou deglutidas. Ao serem deglutidas, atingem o intestino delgado onde se fixam na mucosa, diferenciando-se em fêmea partenogênica, que passa a

liberar ovos (SIDDIQUI; BERK, 2001; COSTA-CRUZ, 2016; PAGE; JUDD; BRADBURY, 2018).

Os ovos são eliminados na mucosa intestinal e antes de atingirem o intestino grosso eclodem liberando larvas rabditoides juntamente com as fezes ocorrendo sua diferenciação de L2 para L3 em condições apropriadas no ambiente como solo arenoso, umidade alta, temperatura entre 25° a 30° e ausência de luz solar direta, configurando o ciclo de vida parasitário ou direto. Neste ciclo, além de ocorrer a heteroinfecção, também pode ocorrer a autoinfecção, que consiste na diferenciação de larvas rabditoides em larvas infectantes L3 no organismo do hospedeiro. A diferenciação de lavas L2 para L3 pode ocorrer no intestino do hospedeiro devido a problemas no trânsito intestinal, como também, na região perianal devido à más condições de higiene pessoal, por vez as larvas infectantes L3 invadem a mucosa intestinal ou perianal, alcançando a corrente sanguínea, dando continuidade ao ciclo de vida (COSTA-CRUZ, 2016; NUTMAN, 2017).

No ciclo de vida livre ou indireto as larvas rabditoides podem diferenciar-se em machos e fêmeas de vida livre que ao copularem, liberam ovos larvados, dos quais, em condições ambientais favoráveis, eclodem larvas rabditoides que diferenciam-se em larvas infectantes L3 que podem infectar um novo hospedeiro (MAHMOUD, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; MACHADO et al., 2011a; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016; NUTMAN, 2017).

1.2 Epidemiologia da estrogiloidíase

Com distribuição mundial heterogênea, a estrogiloidíase apresenta áreas de maior incidência/prevalência no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África, algumas ilhas do Caribe e regiões dos Estados Unidos

(GENTA,1989, BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013). Três regiões mundiais foram definidas, de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (< 1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (STUERCHLER, 1981, apud: PIRES; DREYER, 1993).

As larvas de *S. stercoralis* estão sujeitas a tropismos com importância epidemiológica na helmintíase, como o geotropismo negativo (movimento de ascensão das larvas pelas superfícies e outros movimentos, em sentido contrário a terra), histotropismo positivo (fator determinante na penetração das larvas infectantes através da pele que está associado ao termotropismo positivo, hidrotropismo positivo, quimiotropismo ao O₂) e quimiotropismo negativo ao CO₂ (MORAES, 1948).

Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto que nos trópicos acomete, principalmente as crianças, pela frequente permanência em solos contaminados (GROVE, 1996). A doença é endêmica em vários países tropicais e subtropicais, particularmente os que apresentam infraestrutura em desenvolvimento, porém também ocorre em nações desenvolvidas, como nos Estados Unidos da América, Austrália, Espanha e Itália (PAGE; JUDD; BRADBURY, 2018). Em países desenvolvidos as taxas de infecção pelo parasito estão relacionadas aos imigrantes e refugiados, atingindo valores de 75%; na maioria das vezes os indivíduos parasitados são assistidos nas regiões que os hospedam, aumentando a taxa de infecção local, sendo esta variável dependente do país de origem do indivíduo infectado (SCHÄR et al., 2013). A prevalência relatada em imigrantes e refugiados pode estar subestimada devido à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos (PAGE; JUDD; BRADBURY, 2018).

Na América Latina, a estrogiloidiase humana, apresentou áreas de alta prevalência (> 20%) como na Argentina, Equador, Venezuela, Peru e Brasil (BUONFRATE et al., 2014). No Brasil as taxas de infecção variam de acordo com as diversas regiões e métodos de escolha para

o diagnóstico parasitológico (PAULA, COSTA-CRUZ, 2011). A ocorrência de *S. stercoralis* no município de Uberlândia – MG, analisada pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (LUTZ, 1919), nos anos de 1998 a 2002 apresentou positividade de 2,4%, em crianças (DE PAULA et al., 2000) e 33,3%, em grupos de alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002).

1.3 Aspectos clínicos da estrogiloidiase

Normalmente, na estrogiloidiase, muitos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto que outros podem apresentar desconfortos intestinais. As manifestações clínicas, estão relacionadas a migração das larvas pelo organismo. Devido a penetração das larvas na pele, pode apresentar edema localizado, prurido e observar larvas migrando para derme, denominada síndrome da larva *currens* (NUTMAN, 2017).

Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem expectoração, dispnéia, crises asmátiformes decorrentes das larvas filarioides e ocasionalmente das fêmeas, que podem atingir a maturidade liberando larvas rabditoídes. A migração e a diferenciação das larvas filarioides, pode provocar rompimento dos capilares alveolares, causando hemorragias e infiltrado inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e em casos mais graves, provocar a Síndrome de *Loeffler*, edema pulmonar e insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; MUKERJEE et al., 2003; SIEGEL; SIMON; 2012; COSTA-CRUZ, 2016; NUTMAN, 2017).

A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resulta em reação inflamatória, podendo ocorrer a síndrome de má absorção, diarreia crônica com perda protéica, dor abdominal, hemorragia com desenvolvimento de quadros de

hipoalbuminemia e anemias (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; BOULWARE et al., 2007; TOLEDO; MUNOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; NUTMAN, 2017).

A intensidade dos sintomas está relacionada com a carga parasitária no intestino do indivíduo. No entanto, em casos de imunossupressão, como os induzidos pela infecção do vírus linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1), tratamento com corticosteróides ou quimioterapia citotóxica, pode ocorrer aumento exacerbado da carga parasitária levando à síndrome de hiperinfecção e até mesmo a disseminação das larvas pelo corpo, sendo esta última associada a um mau prognóstico (MARCOS et al., 2008; ROXBY; GOTTLIEB; LIMAVE, 2009; BON et al., 2010; NUTMAN, 2017).

1.4 Resposta imune do hospedeiro

O sistema imune do hospedeiro determina os fatores e evolução da infecção, desenvolvendo imunoglobulinas das classes IgG, IgA, IgM e IgE. As respostas imunes apresentam perfil Th1 e Th2, sendo o último predominante na resposta contra *S. stercoralis* (GENTA, 2004; RODRIGUES et al., 2007; MACHADO et al., 2007, 2009, NUTMAN, 2017).

Pesquisas recentes sugerem que após o estabelecimento de *S. stercoralis* em humanos, geralmente após seis a sete semanas, a infecção induz resposta sistêmica de citocinas associadas ao perfil anti-inflamatório Th2 (ANURADHA et al. 2015; NUTMAN, 2017). Esta resposta sistêmica parece refletir na expansão de células antígeno-específico do tipo Th2/Th9 juntamente com células do tipo Th1 e Th17, sendo a última dependente da interleucina 10 (IL-10) (GEORGE et al. 2014; ANURADHA et al. 2016; NUTMAN, 2017).

As larvas filarioides infectantes ao invadirem a pele produzem infecção local ativando diversos tipos de células, tais como células linfoides inatas, macrófagos, células dendríticas, células natural *killers*, eosinófilos e basófilos/mastócitos. Nesta fase precoce da infecção, ou no

momento em que as FP se estabelecem no intestino delgado do hospedeiro, o parasito induz a diferenciação de um pequeno número de células do tipo Th1/Th17 e um número relativamente maior de células Th2 que juntamente a anticorpos IgE, podem levar a destruição de alguns parasitos. O parasito, ao iniciar a produção e liberação de larvas, estimula o sistema imune a promover a expansão de células Th2/Th9 CD4+, com ação complementar de células Th1/Th17 e indução de macrófagos alternativamente ativados. Com a evolução da infecção crônica, de longa duração, há uma expansão associada de células T reguladoras (T-regs) produtoras de IL-10 e/ou TGF β e uma menor ativação de células Th2/Th9 (NUTMAN, 2017).

Em camundongos infectados com *S. stercoralis* a imunidade inata promove o recrutamento de neutrófilos para o microambiente onde estão localizadas as larvas filarioides infectantes, resultando na produção adicional de quimiocinas como *Macrophage Inflammatory Protein* - MIP-2, e *Neutrophil Chemokines* - KC. Os componentes do parasito induzem o recrutamento de eosinófilos necessários para a resposta imune inata. As proteínas granulares dos eosinófilos (*major basic protein*-MBP em camundongos e *eosinophil cationic protein*-ECP em humanos) apresentam toxicidade para as larvas infectantes, atuando na eliminação do parasito. Os eosinófilos também atuam como células apresentadora de antígenos - APC, apresentando antígenos parasitários e induzindo a ativação de células Th2 (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

Os neutrófilos, ao entrarem em contato com o parasito, induzem sua própria morte por apoptose e liberam substâncias, como as armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps* -NETs), que inativam e capturam o parasito. A mieloperoxidase (MPO), liberada pelos neutrófilos, atuam diretamente no parasito, causando sua morte, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Os componentes do sistema complemento (C3b), atuam induzindo granulócitos a atacar o parasito, para causar sua morte (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

A imunidade adaptativa a *S. stercoralis*, em camundongos, inicia com eosinófilos atuando como células apresentadoras de antígenos, estimulando células T CD4+ a secretarem IL-5, IL-4 e citocinas do perfil Th2. A IL-5 derivada das células Th2, ativam eosinófilos, que em conjunto com as células B, induzem a produção de IgM específica. A IL-4 é necessária para o desenvolvimento de macrófagos alternativamente ativados, que interagem com neutrófilos, sistema complemento e IgM, para eliminar a larva durante a resposta imune adaptativa. A morte acelerada de larvas filarioides (L3), pela ação de neutrófilos durante a resposta adaptativa, é mediada via MPO, componentes do sistema complemento (C3) e dependente de IgG (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

Na estrogiloidíase, alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros apresentam sintomas leves com cura espontânea. Outros indivíduos, principalmente os imunocomprometidos, podem desenvolver hiperinfecção, com possibilidade de disseminação de larvas para outros órgãos e tecidos (forma disseminada da doença). A variação desses sintomas, podem estar relacionados, com a capacidade do sistema imunológico em desenvolver ou não resposta imune efetiva contra o parasito e do grau da infecção que resultaria em menor ou maior sintomatologia/patogenia (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; FARDET et al., 2007; SAID et al., 2007).

1.5 Imunossupressão na estrogiloidíase

A imunossupressão tem sido associada aos casos de síndrome de hiperinfecção principalmente quando ocorrem alterações na imunidade mediada por células sendo identificados como fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome. As duas condições que foram mais frequentemente reconhecidas como fatores predisponentes ao desenvolvimento da síndrome de hiperinfecção são a utilização de corticosteróides e a infecção pelo HTLV-1.

Estudos da doença disseminada em doentes transplantados, asmáticos, portadores de doença pulmonar crônica e paciente com doença autoimune mostraram que a terapia de corticosteróides tem sido um fator comum no desenvolvimento de uma infecção grave (MEJIA; NUTMAN, 2012).

Em casos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) estudos epidemiológicos atuais sugerem que o HIV não é um fator de risco para estrogilodíase disseminada. O impacto do HIV sobre a susceptibilidade à infecção por *S. stercoralis* não está bem definido (SIEGEL; SIMON, 2012). Ainda não há evidências de que uma baixa contagem de CD4 aumenta o risco de disseminação ou diminui a chance de eliminar a infecção (WALSON et al., 2010). A síndrome de hiperinfecção está associada ao uso de corticosteroides no tratamento da síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (MASCARELLO et al., 2011).

1.6 Modelo experimental na estrogilodíase

Nemátodes parasitos, incluindo *Strongyloides*, são importantes patógenos de humanos e outros animais. Por essa razão, existe um interesse considerável em desenvolver modelos animais de infecção. Neste contexto, as infecções por *S. ratti* e *S. venezuelensis* em roedores têm sido utilizados, particularmente para estudos imunológicos. Uma característica, aparentemente única, da infecção humana por *S. stercoralis* é a ocorrência de autoinfecção interna (LOK et al. 2016). Este fenômeno não ocorre naturalmente com *S. ratti* ou *S. venezuelensis*, nem pode ser artificialmente induzido. Portanto, nenhuma destas espécies são modelos que recapitulam este aspecto da estrogilose humana (VINEY; KIKUCHI, 2017)

O parasito de roedores, *S. venezuelensis*, é frequentemente utilizado como organismo modelo para avaliar interação parasito-hospedeiro, aspectos moleculares durante a infecção,

eficácia de novas terapias e características imunológicas da estrogiloidíase. Também utilizado na padronização de novas técnicas imunológicas para aperfeiçoar o diagnóstico de estrogiloidíase humana (MACHADO et al., 2003; GONÇALVES et al., 2008; MARRA et al., 2011, GONÇALVES et al., 2012a).

S. venezuelensis foi descrito pela primeira vez em ratos na Venezuela (BRUMPT, 1934) e completamente descrito posteriormente nos Estados Unidos da América (VINEY; KIKUCHI, 2017). Amplamente distribuído em regiões quentes do mundo, o *S. venezuelensis*, tem sido relatado em Israel, Brasil e Japão (VINEY E KIKUSHI, 2017).

Como outros parasitos pertencentes ao gênero *Strongyloides*, *S. venezuelensis*, infecta os hospedeiros pela penetração de larvas infectantes na pele (VINEY; KIKUCHI, 2017) e apresentam uma rota de migração em roedores, semelhante à de *S. stercoralis* em seres humanos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008). Após a penetração na pele, as larvas são encontradas em todo o corpo do hospedeiro, na pele, músculos e pulmões, sugerindo que esses locais fazem parte da rota de migração para o intestino (TAKAMURE, 1995).

Ao atingirem o intestino delgado, diferenciam em fêmeas parasitas (fêmeas partenogênicas) e produzem ovos por partenogênese, que são excretados juntamente com as fezes. Os ovos no meio ambiente, liberam larvas, por via homogônica, ou seja, liberam larvas que se tornam infectante; ou por via heterogônica com estágios de vida livre (macho e fêmea de vida livre) que se reproduzem sexualmente fora do hospedeiro, liberando ovos que darão origem as larvas infectantes (HINO et al., 2014). A origem dessas formas evolutiva são influenciadas por fatores ambientais, como resposta imune do hospedeiro, temperatura e pH, porém os mecanismos detalhados que determinam sua rota de desenvolvimento ainda não estão claros (HINO et al. 2014).

O parasito, *S. venezuelensis*, é de fácil manutenção laboratorial. Roedores, como por exemplo ratos, podem ser infectados, por via subcutânea, com larvas infectantes, e a infecção apresentar período patente de 4 a 5 dias após a infecção (dpi) (TAKAMURE, 1995). Uma vez que os animais estejam infectados, as fezes podem ser coletadas e utilizadas como fonte para o crescimento de formas de vida livre. Para *S. venezuelensis*, machos e fêmeas de vida livre são raramente observados nas culturas de laboratório mantidas a 25 ° C. Isso significa que apenas formas filarioides infectantes, de desenvolvimento direto, são produzidas em culturas, com presença a partir de 2 dias de cultura (VINEY; KIKUCHI, 2017).

A produção de larvas em culturas de fezes de ratos infectados experimentalmente geram um grande número de larvas infectantes, que são utilizadas na produção de antígenos heterólogos, que podem ser aplicados no diagnóstico da estrogiloidiase (MACHADO et al., 2003, 2008a, GONÇALVES et al., 2008).

1.7 Antígenos de excreção e secreção

Os helmintos causam danos consideráveis durante a invasão do hospedeiro, migração através dos tecidos, alimentando-se de células hospedeiras e podem persistir por várias décadas. Por meio da evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro, os helmintos criam um ambiente adequado para a sua sobrevivência e simultaneamente limitam o dano excessivo aos tecidos causados pela resposta imunes do hospedeiro (WILBERS et al., 2018). Os produtos de excreção e secreção -E/S, são considerados as ferramentas empregadas pelos helmintos para controlar as respostas de defesa do hospedeiro (HARNETT, 2014; WILBERS et al., 2018).

Estes produtos são uma mistura diversificada de proteínas, glicanos, lipídios e ácidos nucléicos, e embora possam utilizar diferentes mecanismos, em geral, induzem uma resposta tipo2/reguladora no hospedeiro (CROWE et al., 2017). Os produtos de E/S dos helmintos

podem influenciar a apresentação dos antígenos suprimindo a ativação das células do perfil Th1 ou Th17 e apoiando o desenvolvimento das células do perfil Th2. As células dendríticas são alteradas pela inibição de receptores específicos, como CD40, CD80 e CD86, impedindo a síntese de moléculas pró-inflamatórias, auxiliando na mudança para o perfil Th2 (SALGAME; YAP; GAUSE, 2013; HARNETT, 2014).

Várias espécies de helmintos, que parasitam plantas e animais, apresentam nos produtos E/S, proteínas pertencentes à superfamília de proteínas CAP (*Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins*) também chamado de *Sperm-Coating Protein/Tpx/Antigen 5/Pathogenesis-related-1/Sc7* (SCP/TAPS). Essas proteínas, apresentam nomes diferenciados, incluindo *Activation-associated Secreted Proteins* (ASPs) ou mais comumente chamada de *Venom Allergen-Like Proteins* (VALs or VAPs), pois uma nomenclatura uniforme, para proteínas identificadas em helmintos, ainda não foi proposta (CANTACESSI et al., 2009; CANTACESSI; GASSER, 2012; WILBERS et al., 2018). Várias proteínas têm sido propostas como candidatas a vacinas contra infecções de helmintos, algumas dessas proteínas são membros da família CAP (CANTACESSI; GASSER, 2012).

As proteínas SCP/TAPS parecem desempenhar papel chave nos organismos, como por exemplo, defesa contra parasitos, alérgenos e indução de proliferação celular. Há evidências que indicam que, algumas dessas proteínas, são expressas por ancilostomatídeos e *Strongyloides* durante a invasão e estabelecimento em seu hospedeiro (CANTACESSI; GASSER, 2012).

Os avanços em tecnologias genômicas, bioinformáticas, proteômicas e metabolômicas, oferecem excelentes perspectivas para a explorar os sistemas biológicos, a estrutura, a função e as interações moleculares dessas proteínas. Essa abordagem integrada auxilia na desenvolvimento de drogas e/ou vacinas, destinadas a alterar ou interromper vias biológicas chave ou processos associados a SCP/Proteínas TAPS (CANTACESSI; GASSER, 2012).

1.8 Diagnóstico da estrogiloidíase humana

O diagnóstico da estrogiloidíase é realizado a partir de sinais clínicos e sintomas, eosinofilia e diagnósticos sorológicos, porém a detecção de larvas nas fezes é o método que confirma o diagnóstico (GENTA, 1989; LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; GANESH; CRUZ JR, 2011; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

As técnicas de exames coproparasitológicos como Hoffmann, Pons e Janer (1934), Faust; Switz e Tobie (1939) e Ritchie (1948) não são sensíveis na detecção de larvas do parasito. Os métodos de Baermann (1917), modificado por Moraes, Matos (1948), Rugai, Matos e Brisola (1954) e cultura em placa de ágar são mais sensíveis que os demais métodos (SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDRÉ et al., 2006; INÊS et al., 2011; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Na maioria dos casos, em que a carga parasitária é baixa e a liberação de larvas mínima, um único exame de fezes não é suficiente para detectar a infecção em 70% dos casos (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001). As repetições dos exames melhoram a eficiência e aumentam a sensibilidade em diagnosticar a infecção em 50% com três exames e 100% com sete amostras analisadas em série (SIDDIQUI; BERK, 2001). Como o exame de múltiplas amostras de fezes é inconveniente para o paciente, a maioria dos médicos preferem não o utilizar (HIRA et al., 2004).

A detecção de DNA do parasito em amostras fecais utilizando o teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) provou ser um método sensível e específico para o diagnóstico de *S. stercoralis* (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2011; SITTA et al., 2014), embora não seja facilmente adaptável para uso em situações clínicas, nas quais as instalações de laboratório são muitas vezes limitadas (INÊS et al., 2011).

Testes imunodiagnósticos têm sido realizados com sucesso (SIDDIQUI; BERK, 2001). Ensaio como o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), reação de imunofluorescência

indireta (RIFI) e *Western blotting* ou *Immunoblotting* são úteis para avaliação da resposta imune do hospedeiro em formas assintomáticas da infecção auxiliando no diagnóstico clínico por apresentarem maior sensibilidade quando comparados aos métodos parasitológicos (FOGAÇA et al., 1990; LINDO et al., 1994; SUDRÉ et al., 2006; BOSCOLO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012a; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

Uma das limitações apresentadas para o desenvolvimento e padronização de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos homólogos que permitam seu posterior fracionamento e análise (ROSSI et al., 1993; COSTA-CRUZ et al., 1998; FELICIANO et al., 2010).

Pesquisas experimentais têm sido realizadas visando obter antígenos heterólogos. Estudos com espécies de *Strongyloides* que se desenvolvem em roedores e possuem determinantes antigênicos que compartilham epítomos com *S. stercoralis*, tem mostrado resultados satisfatórios, como antígenos heterólogos, no diagnóstico da estrogiloidíase humana (SATO et al., 1990; SATO, KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; MACHADO et al., 2008a; RIGO et al., 2008).

Diferentes preparações antigênicas podem ser utilizadas no diagnóstico da estrogiloidíase humana, sendo frequentemente realizado com extratos totais de larvas infectantes de várias espécies de *Strongyloides*. Estudos têm demonstrado que frações de extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* podem ser utilizados na detecção de infecções por *S. stercoralis* (RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010; GONZAGA et al., 2011). Feliciano e colaboradores (2014) utilizando de técnica de *Phage Display* selecionaram peptídeos miméticos a partir de extrato salino de *S. venezuelensis*, identificando potenciais marcadores de infecção por *S. stercoralis* em soro humano utilizando técnica de *Phage-ELISA*.

As diferentes formas evolutivas do parasito como as FP e os ovos também apresentam potencial uso como fonte antigênica (GONÇALVES et al., 2012b). Em modelos experimentais

infectados por *S. venezuelensis*, o fato de o roedor eliminar ovos nas fezes tem indicado que o uso de extrato antigênico de ovos no diagnóstico seria de grande relevância, ao passo que na estrogiloidíase humana além do extrato antigênico de larva, seria possível o uso de extrato antigênico produzido a partir de FP, visto que é essa forma que se estabelece na mucosa intestinal (GONÇALVES et al., 2012b).

Pesquisas têm sido realizadas com objetivo de melhorar o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase. Os estudos enfatizam a criação de um método diagnóstico confiável, que seja acessível à população com estrogiloidíase. A detecção de anticorpos utilizando antígeno heterólogo tem sido amplamente utilizada no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, especialmente, para levantamentos epidemiológicos (COSTA-CRUZ et al., 1998; MACHADO et al., 2003; GONÇALVES et al., 2012c). No entanto, níveis de anticorpos ainda não diferenciam totalmente entre infecção ativa de resultados sorológicos falsos positivos. Além disso, testes imunodiagnósticos não são capazes de distinguir casos com eliminação de larvas detectáveis em exames coproparasitológicos dos casos com exames de várias amostras fecais negativas para *S. stercoralis*, mas com resultados positivos em ensaios sorológicos. Por essa razão, ainda não foi estabelecida uma estratégia de triagem ideal (SUDARSHI et al., 2003; HIRA et al., 2004).

Os casos de infecções crônicas assintomáticas com baixa eliminação de larvas nas fezes e devido ao aumento de indivíduos imunossuprimidos em decorrência de fatores como: uso de corticóides, aumento de transplante de órgão, HIV, desnutrição, aumento do consumo de bebidas alcoólicas e pacientes com câncer gastrointestinal, evidenciam a importância do estudo da estrogiloidíase (GOMPELS et al., 1991; NOZAIS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; KEISER; NUTMAN, 2004; SAFDAR et al., 2004, MACHADO et al., 2008b). A necessidade de métodos diagnósticos que sejam específicos e sensíveis torna-se cada vez mais importante,

especialmente em casos de imunossupressão, onde a conduta médica para o tratamento da infecção está condicionada a um diagnóstico correto da helmintíase.

A utilização de produtos de E/S de espécies de *Strongyloides* apresentam-se como uma ferramenta alternativa no diagnóstico da estrogiloidíase. Em estudos anteriores utilizando antígeno de E/S de *S. stercoralis*, uma proteína presente no E/S a estrogilastacina, foi detectado em amostras de soro humano, IgE específicas contra essa proteína (VARATHARAJALU et al., 2011). Antígenos somáticos de larvas de *S.venezuelensis* aplicados no diagnóstico da estrogiloidíase experimental e humana enquanto pesquisa para novas ferramentas diagnósticas para a helmintíase em questão encontra-se bem descrita na literatura. Assim o emprego de produtos de E/S de *S. venezuelensis* no diagnóstico da estrogiloidíase e a caracterização de proteínas imunorreativas faz-se necessário para identificar antígenos específicos para posterior emprego no diagnóstico, na construção de proteínas recombinantes e como futuro alvos vacinais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Analisar produtos de excreção e secreção (E/S) de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* no diagnóstico da estrogiloidíase e identificar/caracterizar proteínas imunorreativas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter produtos E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis* “in vitro” em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) ou solução salina tamponada com fosfatos (Phosphate Buffered Saline – PBS).
- ✓ Analisar o perfil eletroforético das preparações obtidas a partir de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.
- ✓ Avaliar a detecção de anticorpos IgG, por ELISA, em amostras de soro de ratos imunocompetentes ou imunossuprimidos e em amostras de soro humano, utilizando TS, RPMI E/S ou PBS E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.
- ✓ Detectar as frações proteicas imunorreativas no extrato TS e produtos RPMI E/S ou PBS E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis* por *immunoblotting* em amostras de soro humano.
- ✓ Identificar as bandas proteicas imunorreativas no *immunoblotting*, por espectrometria de massa e caracterizar por bioinformática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais adotados pelos Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) e Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP), ambos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As amostras de soro humano estão disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses aprovado sob o protocolo de nº 041/2008.

A cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em conformidade com o projeto “Manutenção da cepa de *Strongyloides venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar” aprovado sob o parecer do CEUA/UFU de Nº 075/08.

O presente projeto foi aprovado sob o parecer CEUA/UFU de Nº 019/15 para o uso de animais e sob o parecer CEP/UFU de Nº 1.172.751 para o uso de amostras humanas.

3.2 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* Wistar, pesando entre 120-180g, com idade de 6 a 8 semanas, e mantidos no espaço físico da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR-UFU). Os animais foram divididos em grupos:

- **Grupo IC+:** ratos selvagens infectados com *S. venezuelensis* (n = 6).
- **Grupo IS+:** ratos imunossuprimidos com dexametasona e infectados com *S. venezuelensis* (n = 6).

- **Grupo IC-:** ratos selvagens não infectados (n = 6).
- **Grupo IS-:** ratos imunossuprimidos com dexametasona e não infectados (n = 6).

3.3 Amostras de soro humano

Para a validação do antígeno de E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis* foram utilizadas 150 amostras de soro humano. Os indivíduos foram divididos em cinco grupos:

- **Grupo St+:** 30 amostras de soros de pacientes com diagnóstico positivo para estrogiloidíase comprovado por exame parasitológico de fezes, realizado com três amostras de fezes de cada indivíduo.
- **Grupo St-:** 30 amostras de soro de indivíduos saudáveis, negativos para parasitos intestinais em exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e Hoffman, Pons e Janer (1934).
- **Grupo OP:** 30 amostras de soro de pacientes com outras parasitoses. Ancilostomatídeos (n=4), *Ascaris lumbricoides* (n=5), *Enterobius vermicularis* (n=6), *Giardia lamblia* (n=4), *Hymenolepis nana* (n=4), *Schistosoma mansoni* (n=3), *Trichuris trichiura* (n=1) e *Taenia* sp. (n=3). Todas as amostras de soros foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Ritchie (1948).
- **Grupo CI+:** 30 amostras de soro de indivíduos que apresentam condições imunossupressoras [HIV (n=4), paciente com diabetes melitus tipo 2 (n=4), câncer (n=6), tuberculose (n=5) e pacientes etilista (n=11)] com diagnóstico positivo para estrogiloidíase comprovado por exame parasitológico de fezes, realizado com três

amostras pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), placa de ágar e Hoffman, Pons e Janer (1934).

- **Grupo CI-**: 30 amostras de soro de indivíduos que apresentam condições imunossupressoras [HIV (n=9), paciente com diabetes mellitus tipo 2 (n=4), câncer (n=8), tuberculose (n=3) e pacientes etilista (n=6)] e negativos para parasitos intestinais em exame parasitológico de fezes, realizados com três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), placa de ágar e Hoffman, Pons e Janer (1934).

3.4 Imunossupressão experimental com fosfato de dexametasona

Os ratos do **Grupo IS+** e **IS-** foram imunossuprimidos com fosfato de dexametasona 5 µg/mL em água, durante 5 dias (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998). A solução preparada foi transferida para bebedores, em gaiolas próprias para ratos, e repostada diariamente conforme o consumo pelos animais, durante o período de imunossupressão.

3.5 Obtenção de larvas filarioides de *S.venezuelensis*

O parasito foi mantido experimentalmente pela infecção em ratos da espécie *Rattus norvegicus* Wistar, no REBIR-UFU. Fezes de ratos *Wistar* infectados foram recolhidas e mantidas em cultura de carvão animal por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (1905 apud NEVES et al., 2011). Após cultura, as larvas filarioides foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954), parte foi transferida para um tubo com solução de PBS contendo hipoclorito de sódio (0,025%) e centrifugadas a 1300 g por 5 min. Após a descontaminação das larvas com

solução de hipoclorito de sódio, as larvas foram lavadas três vezes em solução PBS suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina. Entre os passos de lavagem, o tubo foi centrifugado a 1300 g durante 1 min o sobrenadante descartado e repostado (TAZIR et al., 2009).

Ao final dos ciclos de lavagem a suspensão de larvas foi utilizada no cultivo “in vitro” para produção de produtos de E/S. Outra parte das larvas recuperadas sem o tratamento foram utilizadas na infecção experimental e produção do extrato total salino (TS).

3.6 Produção do extrato total salino (TS) de larvas filarioides de *S.venezuelensis*

O extrato total salino (TS), utilizado como controle, foi produzido com aproximadamente 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis* conforme metodologia descrita por Gonzaga e colaboradores (2013), com modificações. As larvas recuperadas foram ressuspendidas em 100 µL de solução PBS a 0,15 M, pH 7, 2 contendo inibidores de proteases (ULTRA Minicomplete, Roche, Alemanha) e rompidas por maceração por meio de ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (total de 5 ciclos). Posteriormente o homogenato foi centrifugado a 12400 x g por 30 minutos a 4° C. O sobrenadante constituiu o extrato TS e foi quantificado, quanto ao conteúdo proteico, pelo método de Lowry (LOWRY et al.,1951) e estocado a -20 °C.

3.7 Infecção experimental e obtenção de amostras de soro dos ratos

Os ratos dos **Grupos IC+** e **IS+** foram infectados experimentalmente pela inoculação de 1500 larvas filarioides de *S. venezuelensis* via subcutânea (s.c). Para a confirmação da infecção experimental, no dia 8 pós-infecção (dpi.), os animais de todos os grupos experimentais foram

colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido. As amostras de fezes dos ratos foram recolhidas e em seguida, realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). Após a contagem de ovos, os animais de todos os grupos foram sacrificados por exsanguinação total, via punção cardíaca, após anestesia (Cloridrato de cetamina na concentração de 60 mg/kg e cloridrato de xilazina 7 mg/kg). O sangue coletado foi centrifugado a 1300 g por 10 min. para obtenção das amostras de soro. O sobrenadante obtido foi recolhido e armazenado a -20° C até o momento do uso. Para a recuperação de FP, o intestino delgado foi removido, colocado em placa de Petri contendo solução salina, seccionado longitudinalmente e incubado a 37° C por duas horas. Após a recuperação foi realizada a contagem do número de FP, segundo Sato e Toma (1990).

3.8 Produtos de Excreção/Secreção (E/S) de larvas filarioides de *S.venezuelensis*

As culturas foram realizadas segundo Soblik e colaboradores (2011), com modificações. As larvas filarioides recolhidas e lavadas foram suspensas em meio de cultura estéril, na capela de fluxo laminar. O meio de cultura foi composto por RPMI 1640 (meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640) suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina) e HEPES [ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico] 10 mM. O PBS foi suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina). As larvas foram incubadas em placas de cultura com 24 poços, em uma concentração aproximada de 30.000 larvas / mL de meio de cultura (RPMI 1640) ou PBS, com um volume de 1 mL por poço, e mantidas a 37°C com tensão de CO₂ a 5% em estufa de cultura. A cada 24h a motilidade das larvas era observada, sendo interrompida a cultura caso aproximadamente 80% das larvas estivessem imóveis. Para padronização do protocolo, para ambos os meios, o período máximo de cultura estipulado foi de 72h. A cada 24h o sobrenadante da cultura era

recuperado e armazenado a -20°C e a cultura reposta com novo meio de cultura ou PBS. Todos os sobrenadantes de cultura foram suplementados com inibidores de protease (ULTRA Minicomplete, Roche, Alemanha) e concentrados utilizando sistema de filtração com membrana Amicon® Ultra-15 10K (Merck Millipore Ltd., Irlanda). O volume de entrada do sobrenadante foi de 15 mL e a saída foi de 500 µL. O produto de E/S foi dosado pelo método Lowry et al. (1951).

3.9 Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do extrato total salino e produtos de E/S de larvas filarioides de *S.venezuelensis*

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada em duplicata para análise do perfil eletroforético do extrato TS e produtos de E/S (RPMI E/S, PBS E/S) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* como também para transferência e realização de *immunoblotting*. As preparações e padrões de peso moleculares foram submetidos à SDS-PAGE 12%, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O mini-gel foi preparado entre placas de vidro, em suporte próprio do sistema completo de cuba eletroforética vertical. Foram utilizados dois tipos de géis: gel de separação e gel de empilhamento. O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl, 0,375 M, pH 8,8, SDS a 1%, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 2mM, solução de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8%, TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamino) a 0,125% e APS (Persulfato de amônio) a 0,125%.

Em seguida, o gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCl a 0,125 M, pH 6,8, SDS a 0,1%, EDTA a 2mM, solução acrilamida/bis-acrilamida a 5%, TEMED a 0,125%, APS a 0,125% e água destilada, depositado na placa e moldado sobre o gel de separação. Antes da

aplicação no gel, as amostras do extrato TS e produtos de E/S foram diluídas em tampão de amostra 10X contendo Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,25%, EDTA 200 mM e sacarose a 20%, e submetidas a aquecimento em banho-maria por 3 min. para desnaturação proteica completa.

O tampão de corrida pH 8,3 foi preparado com solução de glicina a 0,19 M, Tris 0,025 M; SDS 0,075% e EDTA 1,95 M. A migração dos polipeptídios foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 150 V por aproximadamente 1h e 30 min em equipamento para eletroforese SE-300-10A-10 miniVE (Hoefler, EUA). Após a corrida o gel foi corado com Coomassie (LAWRENCE; BESIR, 2009; DONG et al., 2011) ou nitrato de prata pelo método de Friedman (1982).

3.10 ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-*S.venezuelensis* em amostras de soro de ratos infectados experimentalmente

As amostras de soro de ratos foram analisadas utilizando ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de IgG anti-*S. venezuelensis*, segundo Gonçalves e colaboradores (2012c). Placas de microtitulação de baixa afinidade (Greiner Bio-one, Alemanha) foram sensibilizadas com TS, E/S RPMI ou E/S PBS diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 a uma concentração de 5 µg/mL (50 µl/poço) e incubadas por 18 h a 4° C. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T), por 5 min cada, e depois bloqueadas com 200 µl/poço de leite desnatado a 3% diluído em PBS-T (PBS-TM 3%), durante 30 minutos a 37° C. Após 3 ciclos de lavagem, 50 µL das amostras de soro diluídas em PBS-T (1:10), foram adicionadas aos poços individuais e as placas foram incubadas durante 45 min a 37° C. Após três ciclos de lavagem, 50 µL de anti-IgG de rato conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich,

EUA) com PBS-T foi adicionado na titulação ideal (1: 500) e as placas foram incubadas por 45 min a 37 ° C. Após a lavagem, a reação foi revelada pela adição de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂ 30%) (Merck, Alemanha) com o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) e incubado por 15 min em temperatura ambiente em cuba escura. A reação foi interrompida adicionando 25 µL de H₂SO₄ 2 N (Merck, Alemanha). O valor da densidade óptica (DO) foi determinado para cada poço em um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) usando filtro de 492 nm.

3.11 ELISA na detecção de anticorpos IgG anti *Strongyloides* em amostras de soro de humano

As amostras de soro humano foram analisadas por teste ELISA para detecção de IgG anti-*S. stercoralis*, segundo Feliciano e colaboradores (2010) com modificações. Placas de microtitulação de baixa afinidade (Greiner Bio-one, Alemanha) foram sensibilizadas com TS ou RPMI E/S ou PBS E/S diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 a uma concentração de 5 µg/mL, 50 µl/poço e incubadas por 18 h a 4 ° C. As placas foram então lavadas três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) por 5 min cada, e depois bloqueadas com 200 µl/poço de leite desnatado a 3% diluído em PBS-T (PBS-TM 3%) durante 30 minutos a 37 ° C. Após 3 ciclos de lavagem, 50 µL das amostras de soro diluídas em PBS-T (1:80) foram adicionadas aos poços individuais e as placas foram incubadas durante 45 min a 37 ° C. Após três ciclos de lavagem, foram adicionados 50 µL de anti-IgG humana (porção Fc específica) conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS-T com uma titulação de 1: 2000 e as placas foram incubadas durante 45 min a 37 ° C. Após a lavagem, a reação foi revelada pela adição de H₂O₂ 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha) com OPD (Sigma-Aldrich, EUA) e incubado por 15 min em temperatura ambiente em cuba escura. A reação foi interrompida

adicionando 25 µL de H₂SO₄ 2 N (Merck, Alemanha). A DO foi determinada para cada poço em um leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotechnology S / A, Brasil) usando filtro de 492 nm.

3.12 Immunoblotting para detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro humano

O extrato TS e os produtos RPMI E/S ou PBS E/S de larva filarioides de *S. venezuelensis*, submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida com massa proteica aplicada no gel de 250 µg foram transferidos de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

O sistema de eletrotransferência semi-úmido SE302 miniVE blotter (Hoefer, EUA) foi utilizado para acondicionar um *sandwich* com: papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm (Bio-rad, EUA) e papel de filtro. Todo o *sandwich* foi umedecido em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) e colocado em cuba úmida de transferência, para aplicação de corrente elétrica de 300 mA por 1 h e 40 min. Ao término da transferência as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para confirmar as frações proteicas eletrotransferidas. As membranas de nitrocelulose foram cortadas, em tiras de 3mm, e colocadas em cubas apropriadas para a reação de *immunoblotting*. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as tiras foram incubadas com 1 mL/poço de PBS-TM 5% por duas horas, à temperatura ambiente sob agitação horizontal lenta. Em seguida as tiras foram lavadas com PBS-T por seis vezes. Para reação de *immunoblotting* foram utilizados *pool* das amostras de soros humano (10 amostras de cada grupo selecionados com base no maior IE) diluídos em PBS-TM a 1% (1:50), para um volume final de 500 µL/poço e incubados com as tiras por 18 h ou *overnight* a 4°C sob agitação horizontal lenta. Após incubação as tiras foram submetidas a 6 ciclos de lavagens com PBS-T, sendo posteriormente adicionados 500 µL da solução de conjugado anti-IgG humana (porção

Fc específica) conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS-TM 1% (1:1500). Após duas horas sob agitação lenta à temperatura ambiente, as tiras foram submetidas a um ciclo de 6 lavagens com PBS-T. O *immunoblotting* foi revelado com 3,3 diaminobenzidina (DAB) (DAB-SigmaFast tablets, Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA) em tampão salino adicionado de Tris e HCl (TBS-HCl pH 7,4 0,02 M) e H₂O₂ 30%. Após a visualização das frações proteicas reativas, a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada.

Posteriormente, cada tira foi analisada, com base no reconhecimento das frações imunogênicas pelos anticorpos IgG presentes nas amostras de soro testadas. As bandas polipeptídicas foram analisadas de acordo com Gassmann e colaboradores (2009) utilizando o programa computacional de análise de imagens *Image J* versão 1.47 (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA). As massas moleculares relativas das frações proteicas reconhecidas foram determinadas por comparação com marcadores moleculares RecomTM Blue wide Range Prestain Marker (Real Biotech Corporation, Taiwan).

3.13 Espectrometria de massa e análise de bioinformática

3.13.1 Preparação de amostra para espectrometria de massa

Após a análise do *immunoblotting*, as frações proteicas de interesse, ou seja, as que apresentaram especificidade, foram excisadas manualmente de geis SDS-PAGE 1D. Para o prepara os geis foram corados por Coomassie coloidal, em capela de fluxo laminar e previamente lavados com álcool metílico absoluto. As bandas proteicas excisadas/cortadas foram incubadas com 100 µL de acetonitrila (ACN) durante 5 min. à temperatura ambiente,

acondicionadas em microtubos de polipropileno contendo água ultrapura, congeladas e enviadas para análise no setor Biomass – espectrometria de massas e pesquisa proteômica do Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa – CEFAP da Universidade de São Paulo – USP.

3.13.2 Análise de espectrometria de massa

Após extração, os peptídeos foram analisados pela técnica de cromatografia aplicada ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos ETD acoplado ao Easy nanoLC II (Thermo Fisher Scientific, EUA) aplicável, com boa detecção e especificidade em amostras de gel 1D. Os peptídeos foram separados numa coluna C18RP num gradiente de 115 min. As condições instrumentais foram verificadas usando como padrão 100fmol de uma digestão trípica de soro albumina bovina (*bovine serum albumin* - BSA) e o *carryover* das amostras foi completamente removido entre as execuções.

Para a identificação das proteínas foram realizadas buscas em bancos de dados (NCBIInr -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> e Uniprot – <http://www.uniprot.org/>) por meio de *software* Thermo Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando a ferramenta de busca SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/sequest/>), que correlaciona os espectros de MS2 de peptídeos, composto por sequência de aminoácidos, com as sequências depositadas nos respectivos bancos.

O parâmetro *score* (S) representa a soma dos escores de íons de todos os peptídeos que foram identificados. Cobertura (C) é a porcentagem da sequência proteica coberta por peptídeos identificados. Proteínas (P), representa o número de proteínas identificadas em um grupo de proteínas. O número de sequências peptídicas que são únicas para um grupo de proteínas é representado por Peptídeos únicos (PU), sendo estes peptídeos comuns à um grupo específico de proteínas não ocorrendo em outros grupos de proteínas. Peptídeos (Pe) é o número total de

sequências peptídicas distintas identificadas no grupo proteico. PSMs representa o número de correspondências do espectro peptídico. O número de PSMs é o número total de espectros de peptídeos identificados para a proteína. O valor de PSM pode ser superior ao número de peptídeos identificados para proteínas com pontuação elevada porque os peptídeos podem ser identificados repetidamente. O número total de aminoácidos preditos representados pelo parâmetro AAs, enquanto o peso molecular em kDa e demonstrado como PM e o pesos isoelétrico da proteína representado pela notação pI.

3.13.3 Peptídeo sinal

O servidor *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizado para busca dos peptídeos sinais das proteínas. Os parâmetros selecionados foram: *Organism group* < *Eukaryotes*; *Output format* < *Standard*; *D-cutoff values* < *Default (optimized for correlation)*; *Method* < *Input sequences may include TM regions*.

Gráficos com as sequências das proteínas e os valores de *scores* que sinalizam a clivagem do peptídeo durante a translocação da membrana, foram construídos a partir da ferramenta. O *C-score* é o *score* bruto do sítio de clivagem, encontrando-se na posição imediatamente após o local de clivagem (primeiro resíduo da proteína madura). O *S-score* é o marcador do peptídeo sinal, usado na distinção entre as posições dentro dos peptídeos sinal e as posições de partes maduras da proteína e de proteínas sem peptídeo sinal. O *Y-score* é o *score* do local de clivagem, sendo uma combinação (em média geométrica) do *C-score* e a inclinação do *S-score*, resultando em uma melhor predição do local de clivagem.

3.13.4 Construção dos modelos tridimensionais proteicos.

O servidor I-TASSER- *Protein Structure & Fuction Predictions* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) foi utilizado na construção dos modelos de estrutura tridimensional das proteínas selecionando os melhores modelos pelo *c-score*. I-TASSER utiliza-se de três metodologias para composição a estrutura terciária, primeiro foi realizado a modelagem por homologia, seguida por *threading* e por fim *ab initio* (ZHANG, 2008).

O *c-score* é o score de confiança para estimar a qualidade dos modelos previstos sendo calculado com base na significância dos alinhamentos do modelo e dos parâmetros de convergência das simulações de montagem das estruturas, e encontra-se em um intervalo de -5 a 2, onde os valores mais altos significam um modelo com maior confiança. Os modelos com melhor *C-score* gerados pelo *I-Tasser* em formato PDB (*Protein Data Bank*) foram submetidos ao software Pymol 2.0 para edição das características das proteínas. A edição dos arquivos gerados foi realizada pelo *software* PyMol 2.0 (<https://www.pymol.org/>), possibilitando diferentes visualizações das estruturas tridimensionais das proteínas.

A validação das estruturas tridimensionais e análise da compatibilidade de um modelo tridimensional (3D) com a sua própria sequência de aminoácidos (1D) foram realizadas no software VERIFY3D, disponíveis no SAVES *version 4* (*The Structure Analysis and Verification Server*) (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). A plataforma avalia a confiabilidade do enovelamento, determinando os ambientes químicos de cada resíduo do modelo e atribuindo *scores* com referência a uma matriz construída a partir de uma análise estatística envolvendo as estruturas proteicas do PDB (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991). A presença de um *score* positivo, indica, que o modelo tridimensional se encontra bem enovelado (SILVA, 2007). Os *scores* para cada aminoácido são considerados aceitáveis quando

se encontram acima de 0,2, assumindo uma boa compatibilidade quando 80% dos AAs estão acima do limite.

3.13.5 Predição de epítomos de células B

A predição de epítomos de células B foi realizada na plataforma *Immune Epitope Database* (IEDB) (<http://www.iedb.org/>). Por meio da sequência de aminoácidos (código FASTA) foi possível prever os aspectos imunológicos de interesse. O critério linearidade analisado pelo programa computacional Bepipred 2.0 (JESPERSEN et al. 2017).

BepiPred-2.0, um servidor *web* para predição de epítomos de células B baseada em sequência, utilizando apenas em dados de epítomos derivados de estruturas cristalinas, que se presume serem de maior qualidade e de fato resultam em um poder preditivo significativamente melhorado quando comparado a outras ferramentas disponíveis. A escala BepiPred 2 prevê a localização de epítomos de células B a partir de uma sequência proteica, utilizando um algoritmo *Random Forest algorithm trained* em aminoácidos epítomos e não-epítomos determinados a partir de estruturas cristalinas. Uma suavização sequencial de previsão é executada posteriormente. Os resíduos com pontuações acima do limite (valor padrão é 0,5) são previstos como parte de um epítomo e coloridos em amarelo no gráfico (onde os eixos Y representam os *scores* de resíduos e as posições dos resíduos dos eixos X na sequência) e marcados com " E "na tabela de saída. Os valores das pontuações não são afetados pelo limite selecionado (JESPERSEN et al., 2017).

3. 14 Análise estatística

Os dados obtidos por OPG e contagem de FP foi aplicado o teste estatístico de *Mann-Whitney*. Nos ensaios ELISA para detecção de IgG em amostras de soro de ratos foi aplicado

o teste estatístico *Mann-Whitney* com comparação de grupos dois a dois. Na detecção de IgG por ensaio ELISA em amostras de soro humano foi aplicado o Teste *t* com correção de *Welch* com comparação de grupos dois a dois. Para comparação intra-grupo com soro humano conforme a preparação utilizada no teste ELISA (TS, RPMI E/S, PBS E/S), foi empregado o teste de *Friedman* seguido do teste de comparação múltipla de *Dunn's*.

Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$. O *cut off* foi estabelecido por uma curva característica gráfica de operação do receptor – ROC (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995) considerando todas as amostras de todos os grupos para o cálculo utilizando o software Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Valores de $IE > 1$ foram considerados positivos.

Como parâmetros diagnósticos foram calculados a sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia (Acc) (SOPELETE, 2005) e índice de Youden (J). Para este último, valores entre -1 e + 1 são aceitáveis; enquanto valores próximos a + 1 indicam que o teste mostra melhor eficiência (YOU DEN, 1950).

Para a análise estatística do ELISA foi utilizado o software Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

3.15 Normas de biossegurança

Todo o procedimento de coleta, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

4. RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético do extrato total salino e produtos de excreção/secreção de larvas filarioides de *S.venezuelensis*.

A Figura 1 mostra os perfis eletroforéticos das preparações TS, RPMI E/S e PBS E/S de larvas de *S. venezuelensis*, após SDS-PAGE a 12% e coloração com nitrato de prata. A preparação TS apresentou bandas proteicas com pesos moleculares variando de 12 a 110 kDa em um total de 13 bandas, a preparação RPMI E/S apresentou bandas que variaram de 12 a 62 kDa e o antígeno PBS E/S bandas de 12 a 90 kDa. As bandas proteicas de 62, 55, 44, 39, 33, 25, 17, 15 e 12 kDa foram compartilhadas entre todas as preparações, enquanto as bandas de 110 e 22 kDa estavam presentes apenas na preparação TS, e banda de 48 kDa presente apenas no RPMI E/S.

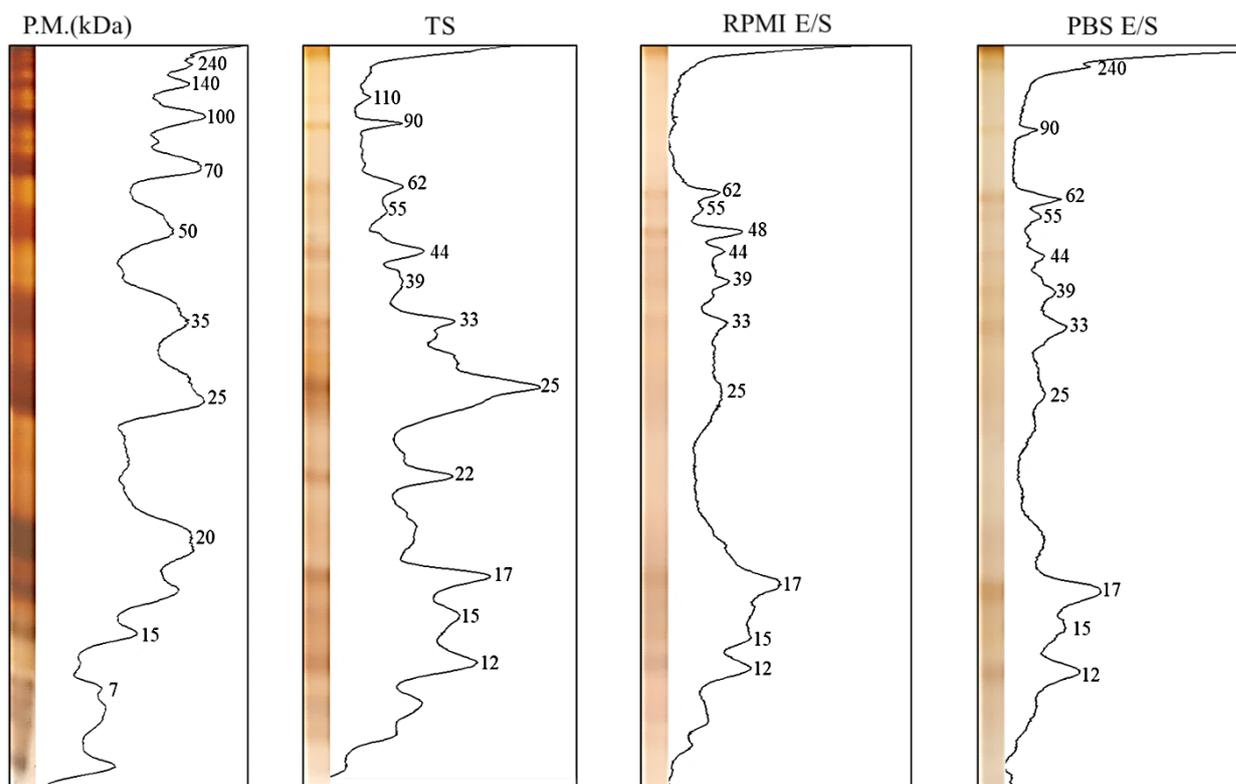


Figura 1. Perfil eletroforético do extrato salino total e produtos de excreção/secreção de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Peso molecular – P.M. Recom Blue wide range – RDC. Bandas em KiloDaltons (kDa). Extrato total salino (TS), excreção/secreção em RPMI (RPMI E/S), excreção/secreção em PBS (PBS E/S).

4.2 Ovos por grama de fezes (OPG) e contagem de Fêmeas partenogênicas (FP) dos ratos infectados com *S.venezuelensis*.

Para observação quanto a instalação da infecção dos grupos experimentais foi realizada a contagem de OPG e após o sacrifício recolhido o intestino delgado dos animais infectados e realizada a contagem do nº de FP. O grupo IS+ apresentou contagem de OPG e contagem de FP maior que o do grupo IC+ com diferença estatística entre os grupos ($p < 0,01$) em ambas contagens (Figura 2).

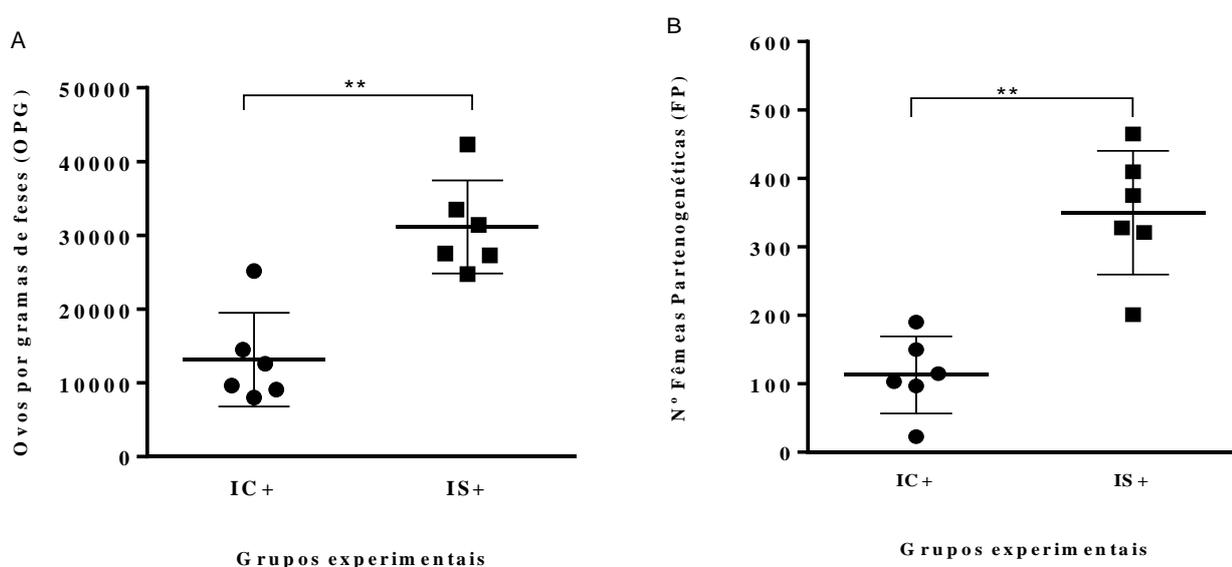


Figura 2. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (A) e contagem de fêmeas partenogênicas (FP) (B) dos ratos infectados com *Strongyloides venezuelensis*. Grupos: Imunocompetentes infectados com *S. venezuelensis* (IC+), Imunossuprimidos infectados com *S. venezuelensis* (IS+). Teste estatístico: *Mann-Whitney* com dados apresentados em média mais o desvio padrão com significância estatística apresentada como ** ($p < 0,01$).

4.3 Detecção de IgG anti-*S.venezuelensis* em amostras de soro de ratos infectados experimentalmente

A detecção de IgG anti-*S. venezuelensis* nas amostras de soro dos ratos dos grupos experimentais foi realizado pelo teste ELISA comparando grupos dois a dois para cada preparação (Figura 3). Na análise da detecção de IgG pelo extrato TS, RPMI E/S e PBS E/S a

média de detecção de IgG no grupo IC+ e IS+ foram maiores que os grupos controles (IC- e IS-) não apresentando diferença estatística entre os grupos IC+ e IS+. Em termos de parâmetros diagnósticos, o RPMI E/S e PBS E/S apresentaram melhores resultados com valores de Es, Acc e J melhores quando comparado ao extrato TS (Tabela 1).

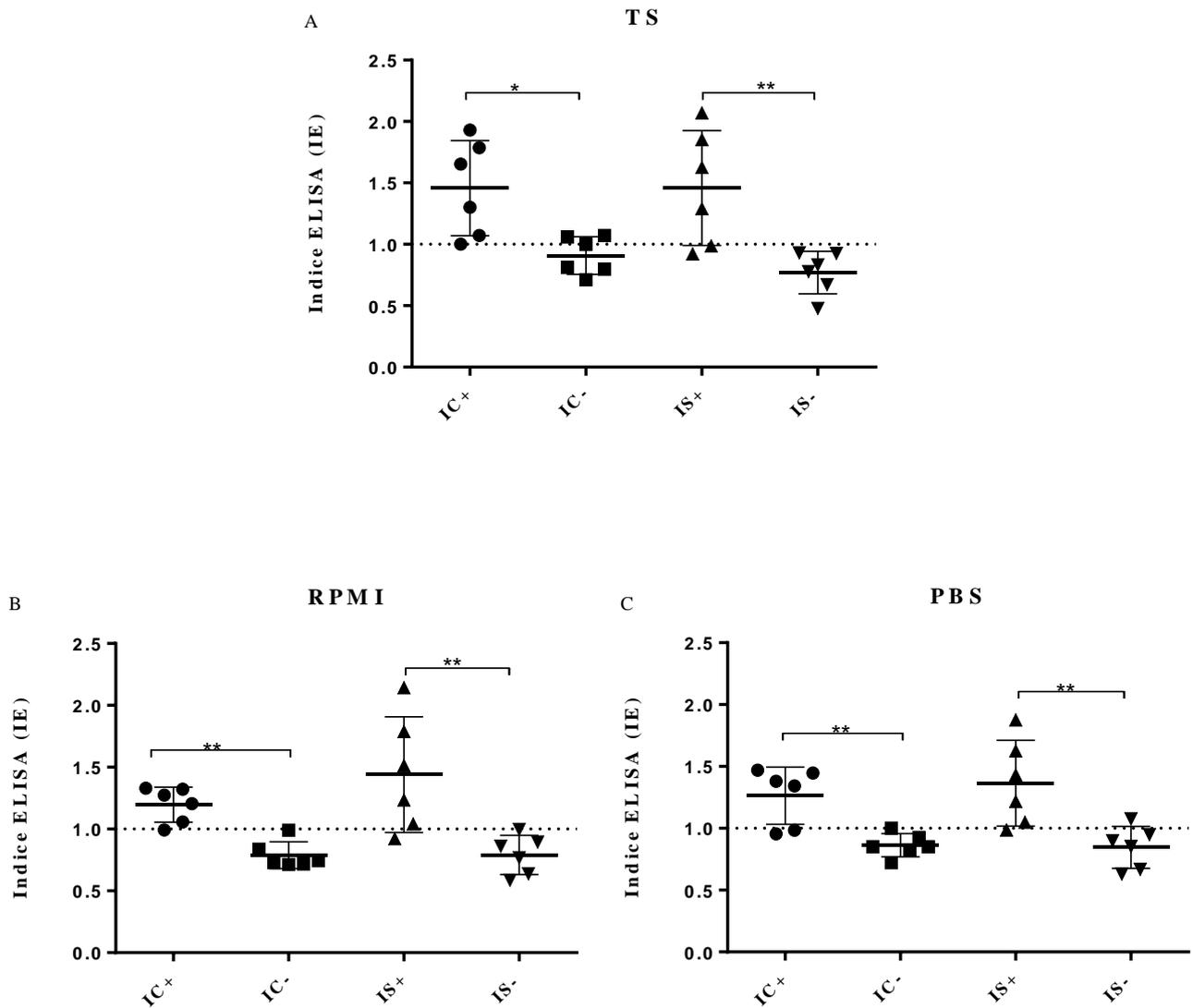


Figura 3. Detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS (A), produtos de E/S em RPMI (B) e E/S em PBS (C) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos. Grupos: imunocompetentes e infectados com *S. venezuelensis* (IC +), imunocompetentes não infectados (IC-), imunossuprimidos e infectados com *S. venezuelensis* (IS +) e imunossuprimidos não infectados (IS-). Teste estatístico: *Mann-Whitney* dados apresentados em média mais desvio padrão. Significância estatística apresentada como: * P <0,05, ** P <0,01. Índice ELISA (IE) > 1, considerado positivo.

Tabela 1. Parâmetros de diagnóstico para extrato total salino (TS), produtos de excreção/secreção em RPMI (RPMI E/S) ou PBS (PBS E/S) produzidos a partir larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*. ELISA aplicado em amostras de soro de ratos infectados com *S. venezuelensis*.

Preparações	Se (%)	Es (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acc (%)	J
TS	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	0,50
RPMI E/S	83,3	100,0	100,0	85,7	92,0	0,83
PBS E/S	75,0	91,7	90,0	78,6	83,0	0,67

Sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia (Acc) e índice de Youden (J)

4.4 Detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro humano.

O teste ELISA foi analisado comparando os cinco grupos de pacientes para cada preparação (TS, RPMI E/S e PBS E/S) (Figura 4). Na análise da detecção de IgG, tanto o extrato TS quanto as preparações RPMI E/S e PBS E/S apresentaram valores médios de IE maiores para os grupos St+ e CI+ ao serem comparados com os grupos controles (St- e CI-) e OP. A análise quanto a imunossupressão, o grupo St+ apresentou valores médios de IE maiores que os grupos CI+ para as três preparações.

Ao comparar a detecção de IgG por grupo entre as três preparações TS, RPMI E/S e PBS E/S, foram observadas diferença estatística para os grupos St+, St- e CI-, entre TS e RPMI E/S, RPMI E/S e PBS E/S. O grupo OP, apresentou diferença entre TS e PBS E/S e RPMI E/S e PBS E/S. O grupo CI+ não apresentou diferença estatística entre as preparações (Figura 5). Em termos de parâmetros diagnósticos PBS E/S apresentou melhor especificidade (88,9%), RPMI E/S apresentou melhor sensibilidade (83,3%) enquanto o TS apresentou desempenho mais limitado (Tabela 2).

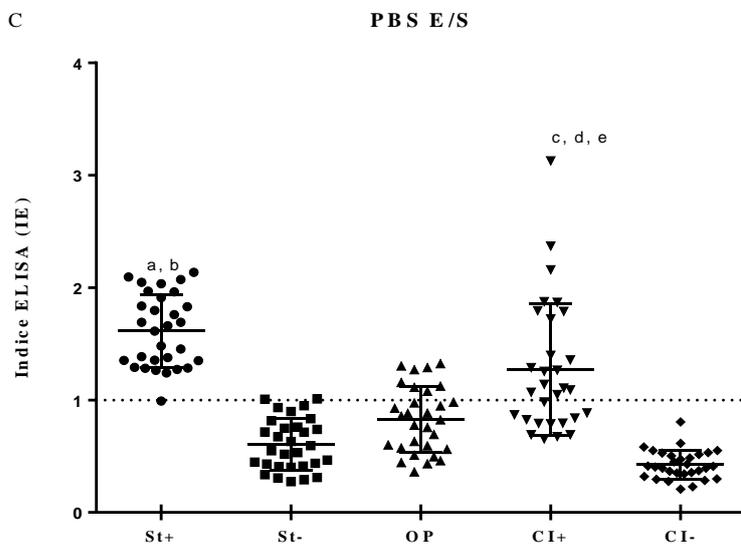
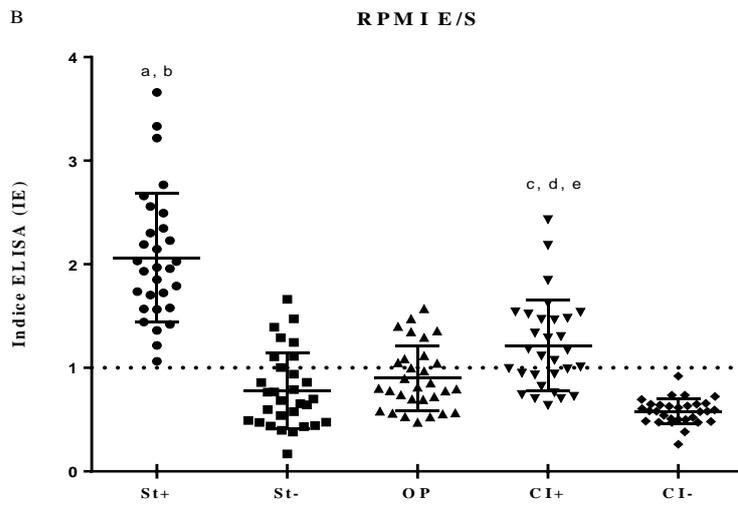
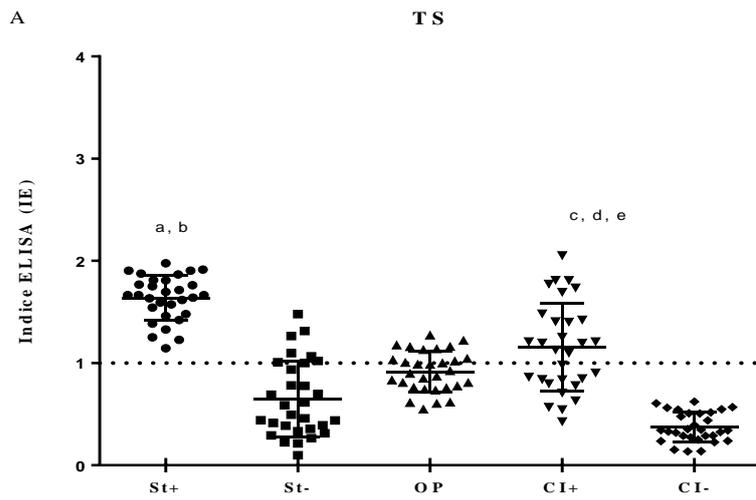


Figura 4. Detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS (A), produtos de E/S em RPMI (B) e E/S em PBS (C) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro humano. Grupos: Indivíduos com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (St+) (n= 30), indivíduos com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (St-) (n=30), indivíduos com diagnóstico positivo para outras parasitoses intestinais (OP) (n=30), indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (CI+) (n=30) e indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (CI-) (n=30). Teste estatístico: Teste *t* com correção de *Welch*. Dados apresentados como média mais desvio padrão. Significância estatística com $p < 0,05$ comparando grupos 2 a 2 (a – St+/St-, b – St+/OP, c – CI+/OP, d – CI+/St+ e e – CI+/CI-). Índice ELISA (IE) > 1, considerado positivo.

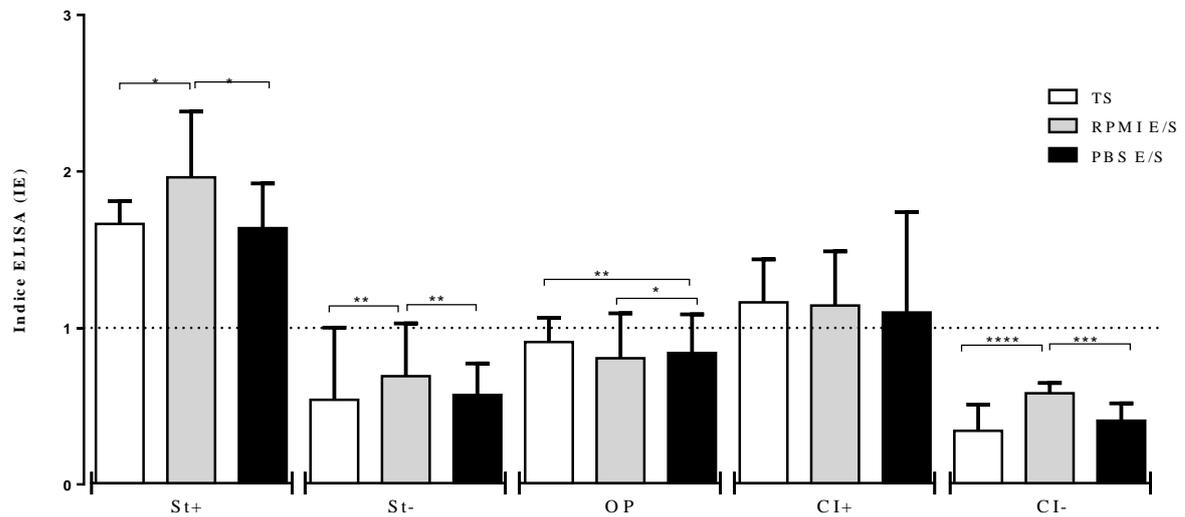


Figura 5. Comparação na detecção de IgG por ELISA utilizando extrato total salino - TS (A), produtos de E/S em RPMI (B) e E/S em PBS (C) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de soro humano. Grupos: Indivíduos com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (St+) (n= 30), indivíduos com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (St-) (n=30), indivíduos com diagnóstico positivo para outras parasitoses intestinais (OP) (n=30), indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (CI+) (n=30) e indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (CI-) (n=30). Teste estatístico: Friedman seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Dados apresentado por mediana mais intervalo interquartil. Significância estatística apresentada como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Tabela 2. Parâmetros de diagnóstico para extrato total salino (TS), produtos de excreção/secreção em RPMI (RPMI E/S) ou PBS (PBS E/S) produzidos a partir larvas filarioides de *S. venezuelensis*. ELISA aplicado em amostras de soro humano.

Preparações	Se (%)	Es (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acc (%)	J
TS	78,3	76,7	69,0	84,1	77,0	0,55
RPMI E/S	83,3	78,9	72,0	87,7	81,0	0,62
PBS E/S	81,7	88,9	83,0	87,9	86,0	0,70

Sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia (Acc) e índice de Youden (J)

4.5 *Immunoblotting* com amostras de soro humano.

Na detecção de IgG por *Immunoblotting*, todas as preparações apresentaram bandas proteicas imunorreativas (Figura 6). As três preparações apresentaram perfil de reconhecimento de bandas semelhantes considerando a condição da presença ou ausência da infecção sem diferenças aparentes/destacáveis entre os preparados. O grupo St+ e CI+ reconheceram bandas nas faixas de 17, 35, 60 a 140 kDa, com destaque para a de 17 kDa que ficaram restritas apenas a esses grupos (Figura 6 A - C). O grupo OP mostrou frações responsáveis por reatividade cruzada, assim como banda inespecíficas foram marcadas nos grupos negativos. Devido a essa especificidade a banda proteica de 17 kDa foi selecionada para análise por espectrometria de massas.

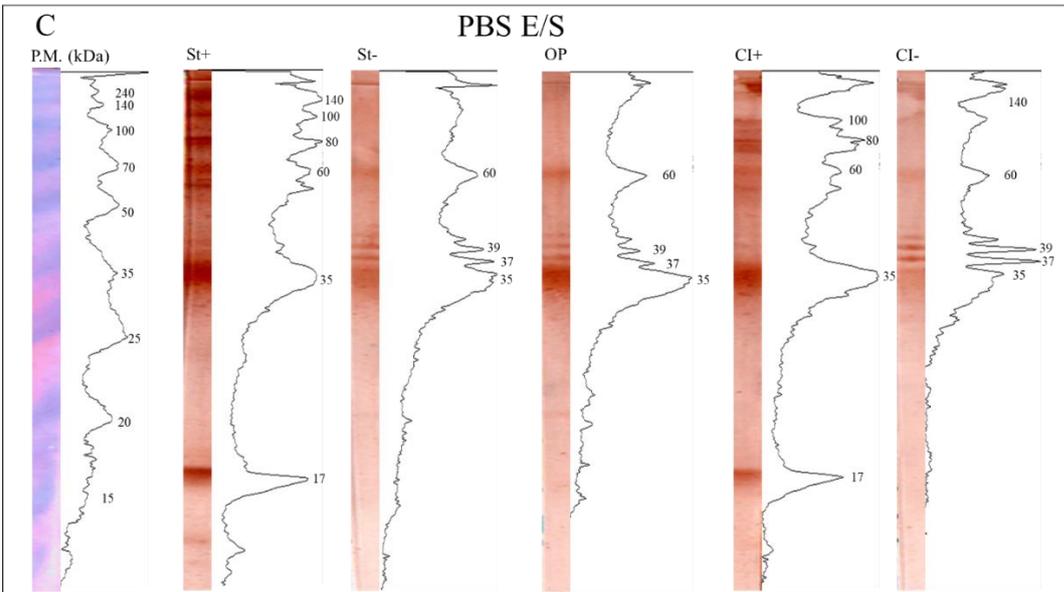
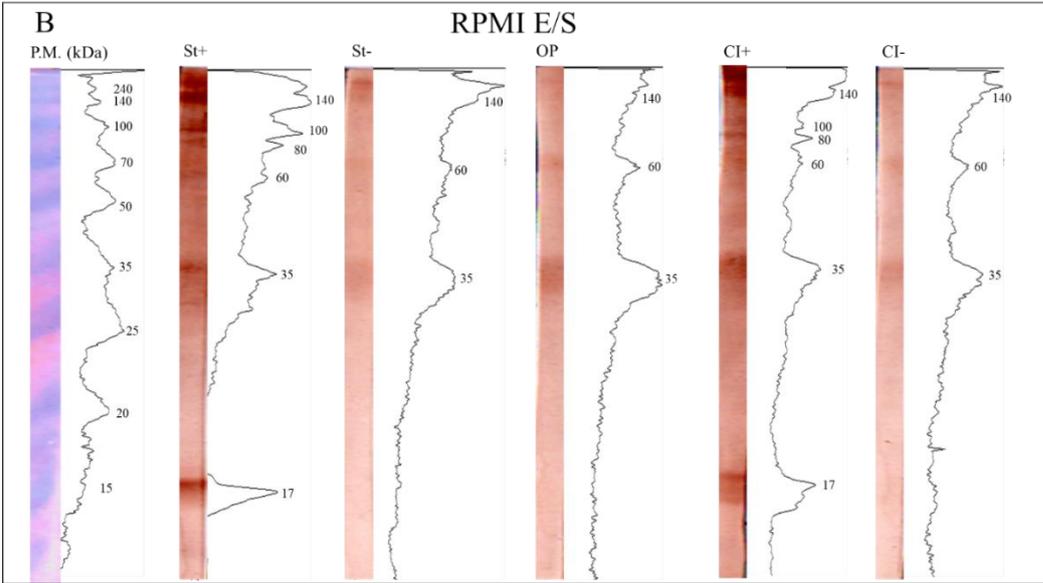
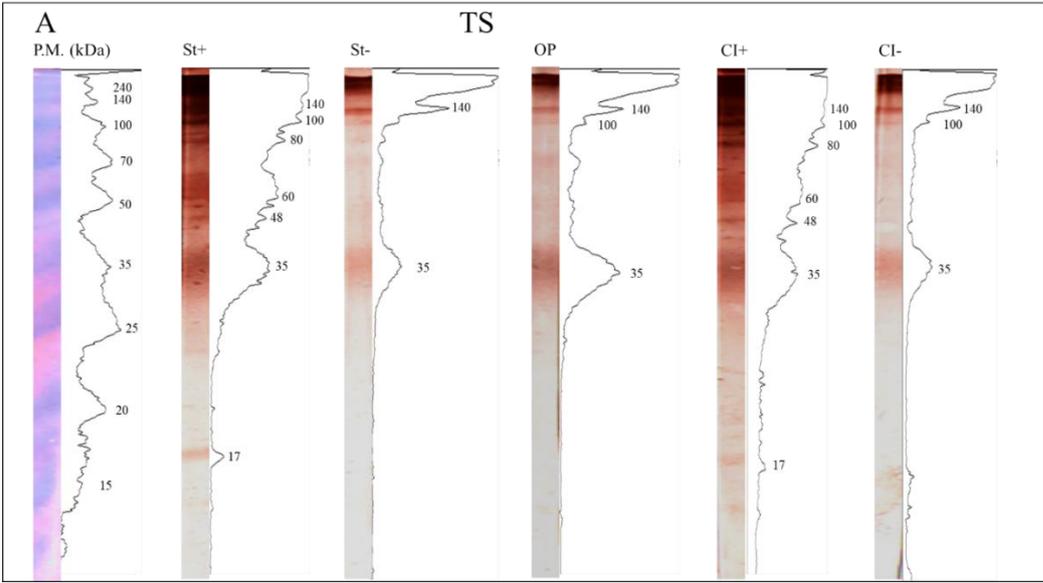


Figura 6. Immunoblotting para detecção de IgG com extrato total salino - TS (A), produtos de E/S em RPMI (B) e PBS (C) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* utilizando pool de amostras de soro humano. Grupos: Indivíduos com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (St+) (n=10), indivíduos com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (St-) (n=10), indivíduos com diagnóstico positivo para outras parasitoses intestinais (OP) (n=10), indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico positivo para estrogiloidiase (CI+) (n=10) e indivíduos em condições imunossupressoras com diagnóstico negativo para parasitoses intestinais (CI-) (n=10). P.M.: peso molecular. Kilodaltons: kDa. Perfis obtidos pela análise no software ImageJ. Valores das bandas proteicas imunorreativas obtidas por comparação aos valores do padrão de peso molecular - P.M.

4.6 Espectrometria de massas.

As bandas proteicas imunorreativas de 17 kDa foram excisadas de geis 1D 12%, corados com Coomassie coloidal e enviadas para análise por espectrometria de massas. As amostras foram enviadas para o setor BIOMASS do Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa – CEFAP da Universidade de São Paulo (Figura 7).

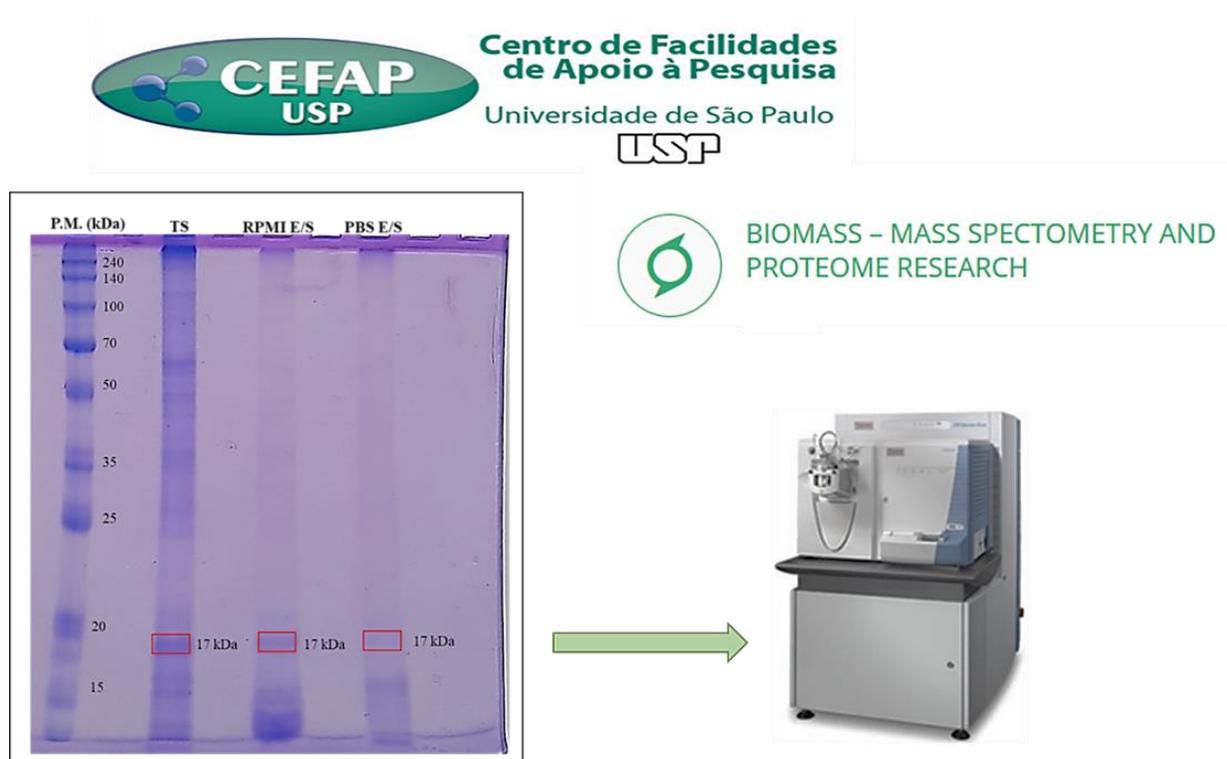


Figura 7. Gel de poliacrilamida com TS, RPMI E/S e PBS E/S corados por Coomassie coloidal. As bandas proteicas de interesse estão marcadas com quadro vermelho. As bandas marcadas foram excisadas e enviadas para análise em espectrometria de massas.

Após análise por espectrometria de massas, foram obtidos os códigos de acesso para cada proteína presente nas bandas proteicas, sendo selecionadas, como identificação correta as que apresentaram maior *score* e cobertura. As proteínas identificadas estão na mesma faixa de peso molecular, aproximadamente 17 kDa. Os parâmetros complementares de análise de cada uma das proteínas estão sumarizados no Quadro 1. Os parâmetros foram obtidos pelo *software* Proteome Discoverer Version 1.4.

A proteína com nº de acesso A0A0K0FJA1 – proteína contendo domínio CAP, foi identificada nas três preparações: TS, RPMI E/S e PBS E/S de larvas filarioide de *S. venezuelensis*, apresentando maior *score* e cobertura para RPMI E/S. A proteína pertence à família de proteínas CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Protein*) pertencente a superfamília CAP (*Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 proteins*). A proteína com domínio CAP (A0A0K0FJA1) apresentou 213 AAs com domínio nas posições 71-202 e peptídeo sinal na posição 1-19.

No extrato TS além da proteína contendo domínio CAP (acesso A0A0K0FJA1) foi identificada uma segunda proteína (acesso nº A0A0K0FHM6) correspondente a uma proteína ligante de cálcio - AT09395p. A proteína ligante de cálcio (A0A0K0FHM6) apresentou 194 AAs com dois domínios *EF-hand* na posição 48-83 e 117-152, e a posição 61-72 representa a região de ligação ao cálcio.

Para os produtos de E/S, três proteínas diferentes foram identificadas, sendo duas para RPMI E/S e uma para PBS E/S. RPMI E/S apresentou duas proteínas pertencentes a superfamília CAP, A0A0K0F4S7 e A0A0K0FX99, ambas possuem 200 AAs e domínio na posição 58-189, diferindo apenas quanto a posição do peptídeo sinal, na posição 1-25 para proteína A0A0K0F4S7 e na posição 1-19 para proteína A0A0K0FX99. O PBS E/S apresentou uma proteína não caracterizada de acesso A0A0K0F262. A proteína A0A0K0F262 apresenta 152 AAs com domínio na posição 4-147 sem presença de peptídeo sinal. A0A0K0F262

apresenta semelhança de sequência com proteínas ligantes de actina tipo ADF (*Actin-Depolymerizing Factor*)/Cofilin.

Quadro 1. Proteínas identificadas nas bandas de 17 kDA, por espectrometria de massas para o extrato total salino (TS) e os produtos de excreção/secreção (RPMI E/S e PBS E/S) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, selecionadas por maior *score* e cobertura

Preparações	Acesso	Descrição	S	C	P	PU	Pe	PSM	AAs	PM	pI
Extrato Total Salino (TS)	A0A0K0FJA1	Proteína contendo o domínio CAP (inferida por ortologia a uma proteína humana) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=3 SV=1 - [A0A0K0FJA1_STRVS]	56,37	9,86	2	2	2	17	213	23,4	9,31
	A0A0K0FHM6	AT09395p (inferido por ortologia a uma proteína de <i>D. melanogaster</i>) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=4 SV=1 - [A0A0K0FHM6_STRVS]	29,07	17,53	1	3	3	9	194	21,6	6,01
RPMI E/S	A0A0K0FJA1	Proteína contendo o domínio CAP (inferida por ortologia a uma proteína humana) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=3 SV=1 - [A0A0K0FJA1_STRVS]	417,81	49,77	1	8	10	147	213	23,4	9,31
	A0A0K0F4S7	Proteína contendo o domínio CAP (inferida por ortologia a uma proteína humana) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=4 SV=1 - [A0A0K0F4S7_STRVS]	295,84	41,50	1	3	9	107	200	22,5	9,19
	A0A0K0FX99	Proteína contendo o domínio CAP (inferida por ortologia a uma proteína humana) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=4 SV=1 - [A0A0K0FX99_STRVS]	274,19	43,00	1	2	8	98	200	22,4	9,09
PBS E/S	A0A0K0FJA1	Proteína contendo o domínio CAP (inferida por ortologia a uma proteína humana) OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=3 SV=1 - [A0A0K0FJA1_STRVS]	63,60	25,82	1	3	5	22	213	23,4	9,31
	A0A0K0F262	Proteína não caracterizada OS= <i>Strongyloides venezuelensis</i> OX=75913 PE=3 SV=1 - [A0A0K0F262_STRVS]	11,66	13,16	1	2	2	5	152	16,8	6,54

* - Proteína presente nas três preparações. S – *score*, C – cobertura, P – proteína, PU – Proteína única, PE – Peptídeos. OS- nome do organismo, OX – identificador o organismo, PE – existência da proteína, SV – versão da sequência.

4.7 Peptídeo sinal

Para análise quanto a presença de peptídeo sinal foi realizada a análise pelo servidor SignalP 4.1 Server (PETERSEN et al., 2011). Das cinco proteínas analisadas apenas três delas apresentaram região equivalente a possível presença peptídeo de sinal. As proteínas A0A0K0FJA1, A0A0K0F4S7 e A0A0K0FX99 apresentaram região de peptídeo sinal, com *S-score* acima do valor de referência (0,5) representados nos gráficos gerados pelo servidor Signal IP 4.1, (Figura 8).

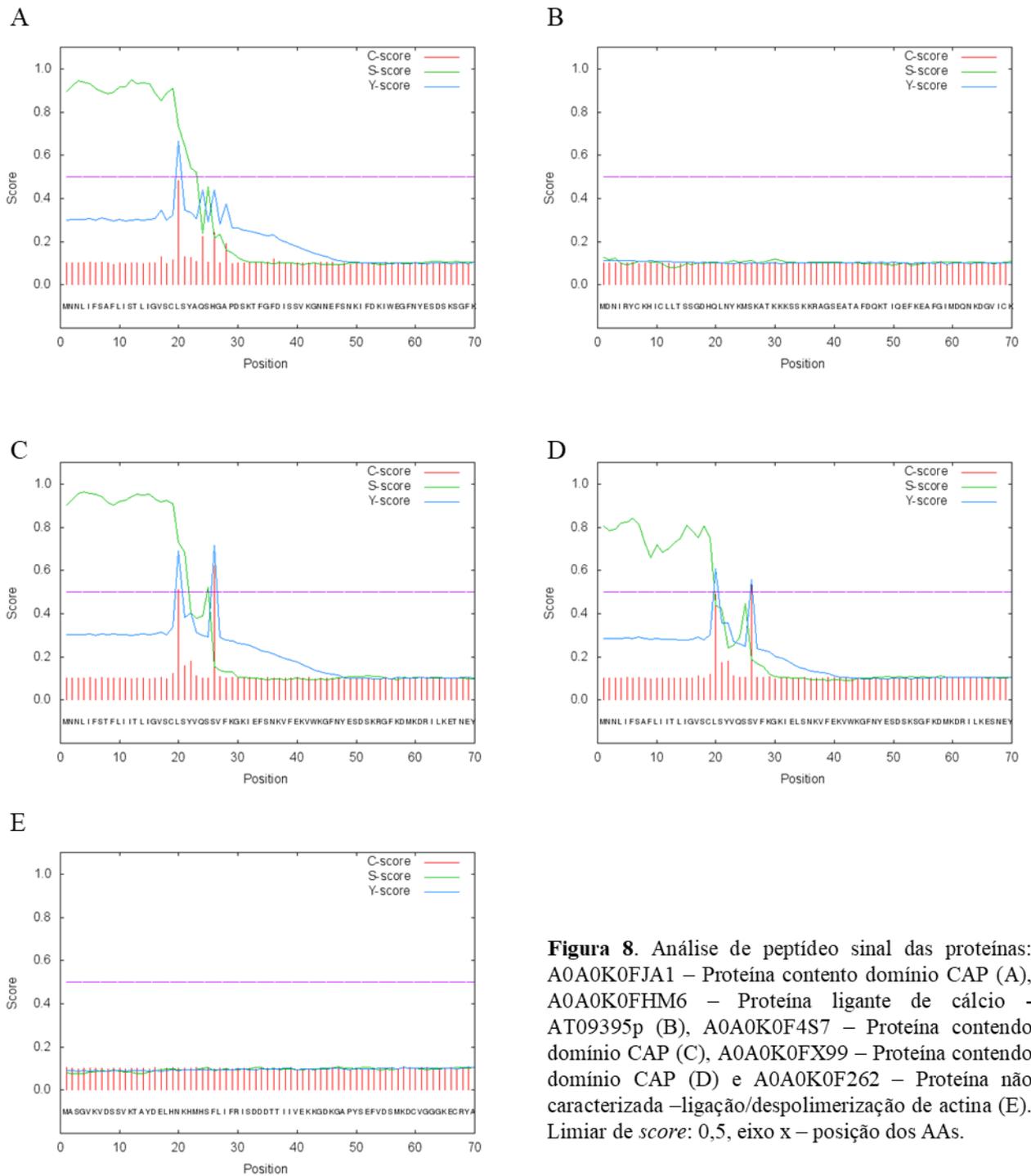


Figura 8. Análise de peptídeo sinal das proteínas: A0A0K0FJA1 – Proteína contendo domínio CAP (A), A0A0K0FHM6 – Proteína ligante de cálcio - AT09395p (B), A0A0K0F4S7 – Proteína contendo domínio CAP (C), A0A0K0FX99 – Proteína contendo domínio CAP (D) e A0A0K0F262 – Proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina (E). Limiar de *score*: 0,5, eixo x – posição dos AAs.

4.8 Modelagem e análise dos modelos tridimensionais proteicos.

Os modelos tridimensionais foram construídos pela plataforma on-line *I-tasser* e selecionados aqueles modelos que apresentaram valores de *c-score* maiores (Quadro 2).

Quadro 2. Valores de *C-score* obtidos pela plataforma online *I-Tasser* na construção de modelos tridimensionais das proteínas identificadas em preparados antigênicos de *Strongyloides venezuelensis*.

Proteínas/aceso	<i>C-score</i>
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FJA1	-1,77
Proteína ligante de cálcio - AT09395p - A0A0K0FHM6	-2,33
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0F4S7	-1,33
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FX99	-1,23
Proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina - A0A0K0F262	1,29

As características de cada uma das proteínas identificadas foram evidenciadas na construção dos modelos tridimensionais, marcando em azul toda a cadeia das proteínas, em vermelho o peptídeo sinal, em magenta sítios de ligação e em verde os domínios (Figuras 9 A, B; 10 A, B; 11 A, B; 12 A, B). Cada proteína foi representada em formato *cartoon* e esfera, exceto proteína contendo domínio CAP – A0A0K0FX99.

Todas as proteínas apresentaram compatibilidade entre o modelo 3D/1D com 80% dos aminoácidos com score > ou = 0,2 (Tabela 3), exceto a Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FX99 (gráfico não representado).

Tabela 3. Percentual de validação da estrutura tridimensional obtidos pelo programa VERIFY3D.

Proteínas/acesso	(%)
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FJA1	90,14
Proteína ligante de cálcio - AT09395p - A0A0K0FHM6	80,41
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0F4S7	86,00
Proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FX99	70,00
Proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina - A0A0K0F262	86,84

Nos gráficos gerados pelo software VERIFY3D (Figuras 9 C, 10 C, 11 C, 12 C), a média dos aminoácidos dentro do *score* são coloridos de azul (*average score*) enquanto os valores brutos dos escores dos aminoácidos são representados em verde (*raw score*).

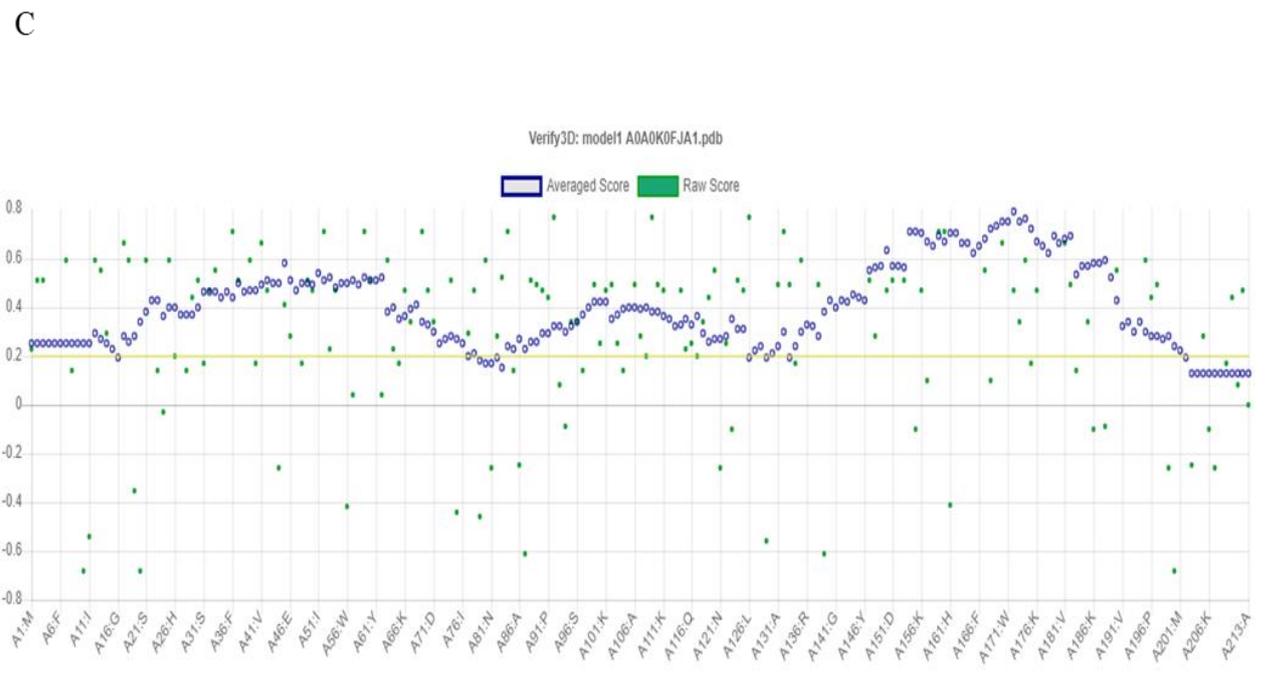
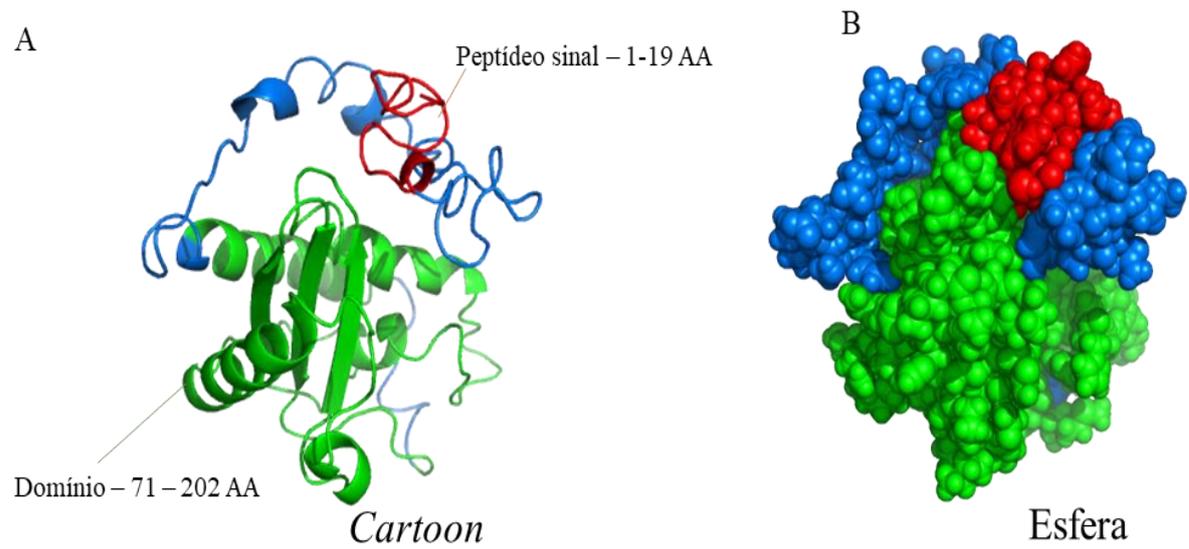


Figura 9. Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0FJA1 – Proteína contendo domínio CAP - Família CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) - proteína identificada nas três preparações (TS, RPMI E/S e PBS E/S). Formato cartoon (A), formato esfera (B), gráfico gerado pelo software VERIFY3D (C). *Averaged score* – média dos scores do aminoácido, *Raw score* – score bruto de cada aminoácido.

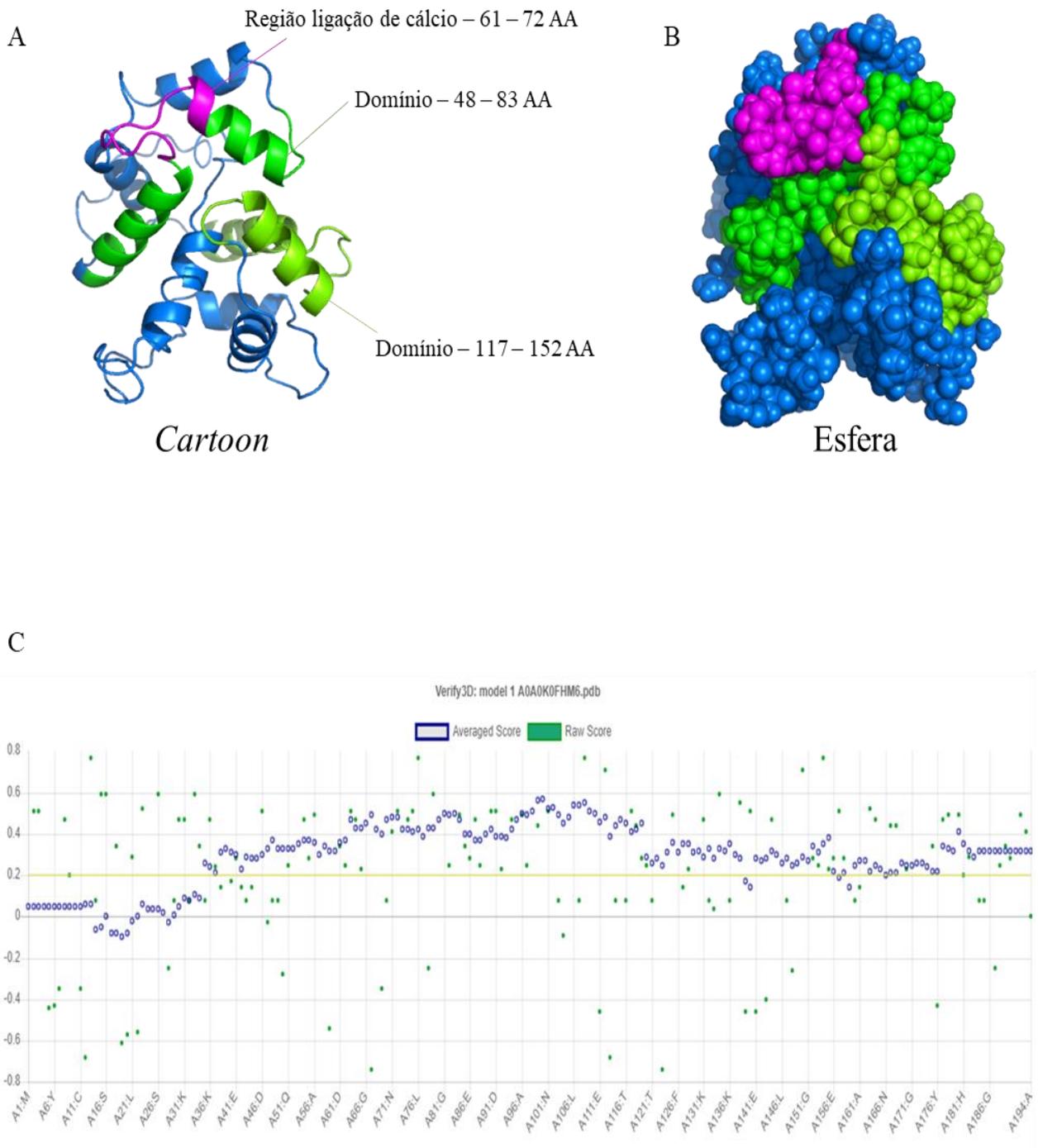


Figura 10. Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0FHM6 – Proteína ligante de cálcio* AT09395p - proteína identificada no extrato Total Salino –TS. Formato cartoon (A), formato esfera (B), gráfico gerado pelo software VERIFY3D (C). *Averaged score* – média dos scores do aminoácido, *Raw score* – score bruto de cada aminoácido.

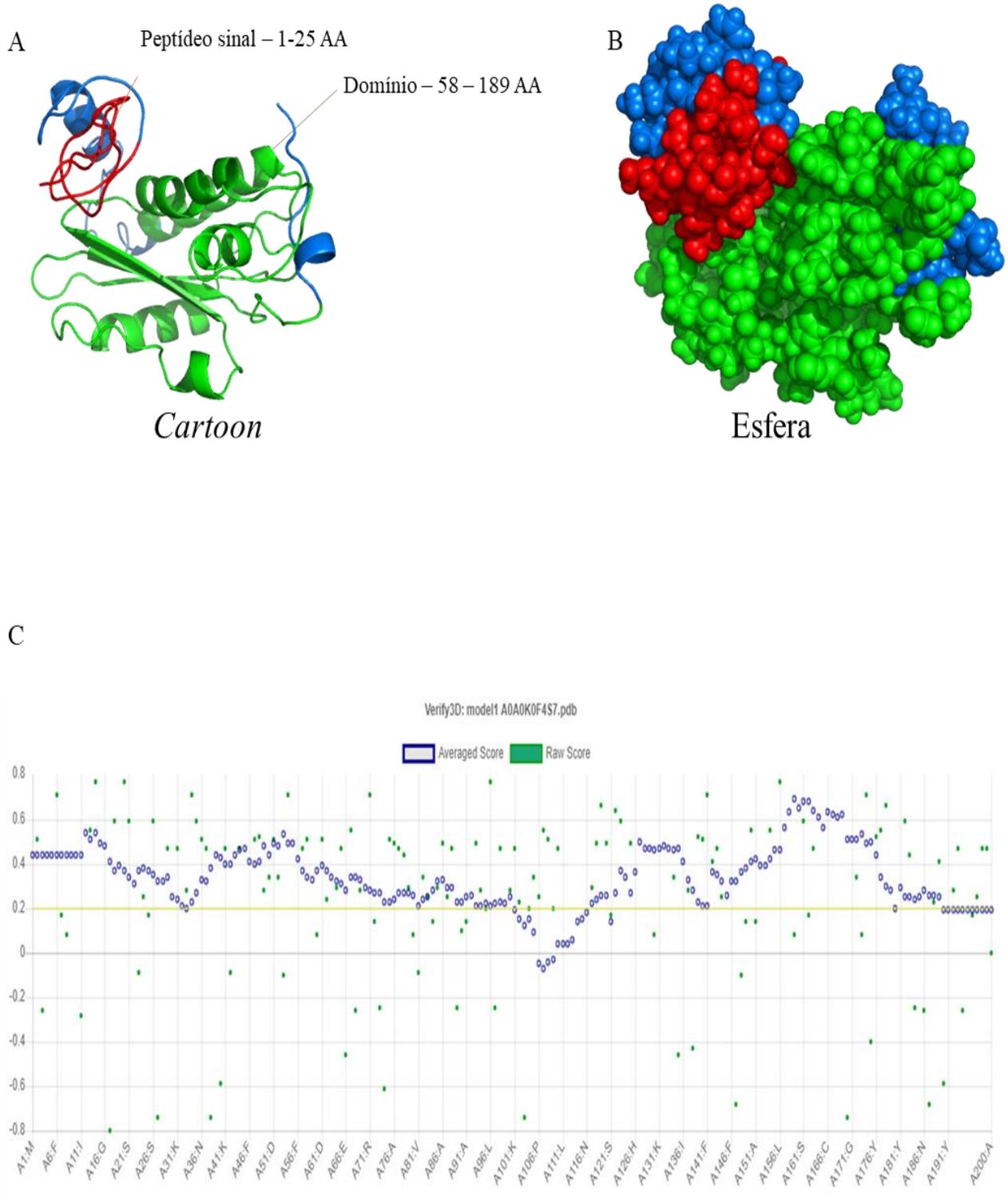


Figura 11. Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0F4S7 – Proteína contendo domínio CAP* - Família CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) identificada no produto RPMI E/S. Formato cartoon (A), formato esfera (B), gráfico gerado pelo software VERIFY3D (C). *Averaged score* – média dos scores do aminoácido, *Raw score* – score bruto de cada aminoácido.

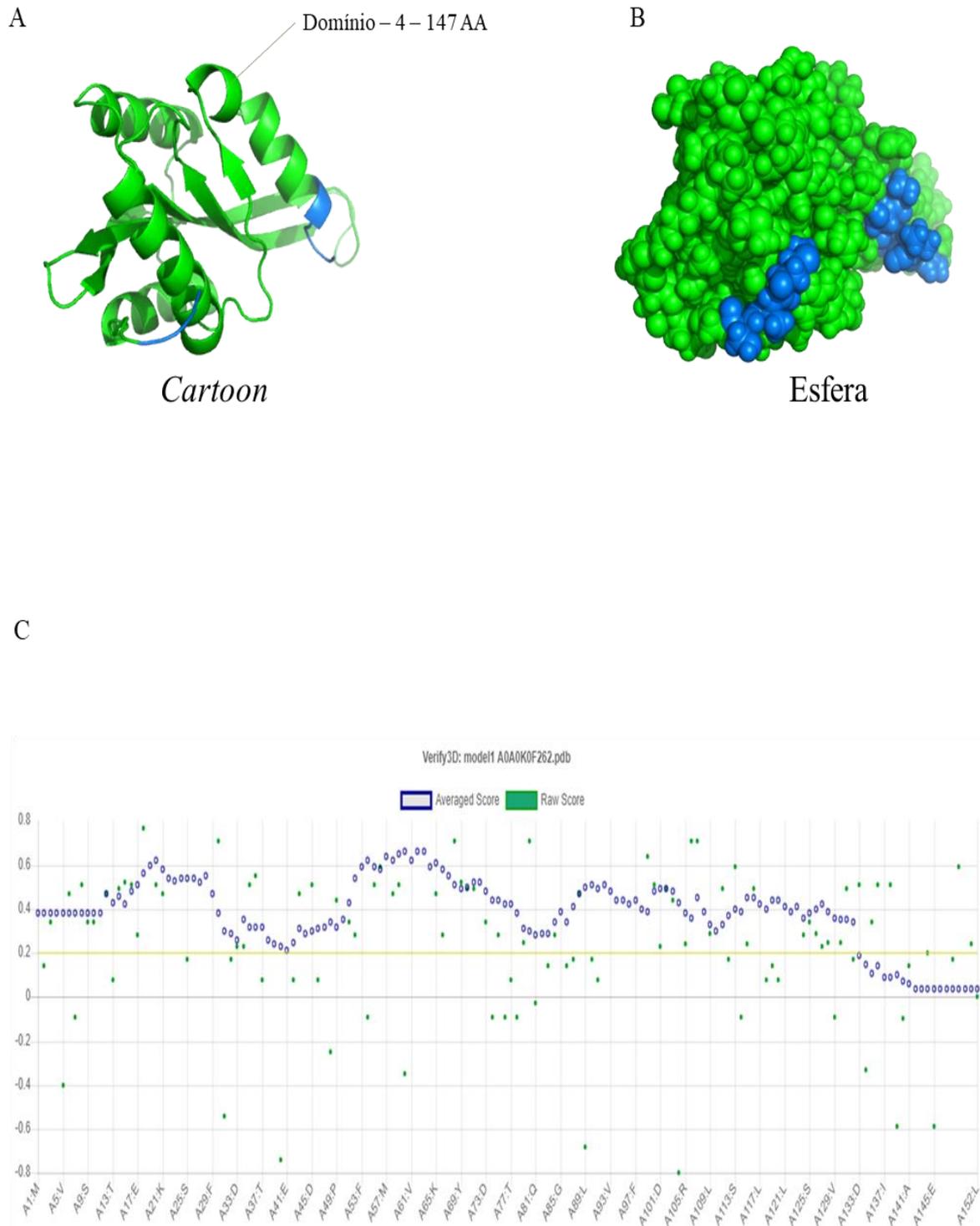


Figura 12. Modelagem tridimensional da proteína A0A0K0F262 – Proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina identificada no produto PBS E/S. Formato cartoon (A), formato esfera (B), gráfico gerado pelo software VERIFY3D (C). *Averaged score* – média dos scores do aminoácido, *Raw score* – score bruto de cada aminoácido.

4.9 Predição de epítomos de célula B.

Os peptídeos previstos na análise de predição de epítomos de célula B estão representados no Quadro 3. Para proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FJA1, foram identificados 7 peptídeos preditos como epítomos de células B, enquanto para proteína ligante de cálcio - A0A0K0FHM6 foram 6, 8 peptídeos preditos para proteína contendo domínio CAP - A0A0K0F4S7, 7 para proteína CAP A0A0K0FX99 e 3 para proteína não caracterizada - A0A0K0F262.

Na figura 13 estão representados os gráficos obtidos pelo *Bipipred 2.0*, demonstrando a posição dos aminoácidos na cadeia de cada uma das proteínas para cada um dos critérios. No eixo x temos a posição e no eixo y o valor do *score* para cada análise, destacando o valor do *threshold* para cada um dos parâmetros.

Quadro 3. Resíduos previstos pelo programa computacional *Bipipred 2.0* das proteínas identificadas em preparados antigênicos de *Strongyloides venezuelensis*.

Proteína	Previstos	Início	Final	Peptídeo (sequência)	Comprimento
CAP A0A0K0FJA1	1	5	49	IFSAFLISTLIGVSCLSYAQSHGAPDSKTFGFDISSVKGNNEFSN	45
	2	58	70	GFNYESDSKSGFK	13
	3	75	133	RILKESNEYRAAHDAPLTVDSAIAQKAQAYAEHLAKIGKMQHDPT NQKNKLGLENLAFA	59
	4	140	152	IGVKGWYDEVKDY	13
	5	161	161	H	1
	6	164	191	GHFTQLVWKSSSKVGCVAAGSKGVFTV	28
	7	194	210	YSPAGNLMGAFEKNVSP	17
Ligante cálcio A0A0K0FHM6	1	5	92	RYCKHICLLTSSGDHQLNYKMSKATKKKSSSKRAGSEATAFDQKTI QEFKEAFGIMDQNKDGVICKNDLKDLYASMGQIASEKQIDDM	88
	2	108	121	LFGERLTGTDPEQT	14
	3	123	123	V	1
	4	129	138	FDKKESGKIT	10
	5	153	153	P	1
	6	159	191	IKAMYKGNPPIDGGMVDYKAFALHITGAQDEL	33
CAP A0A0K0F4S7	1	5	41	IFSTFLIITLIGVSCLSYVQSSVFKGKIEFSNKVFEK	37
	2	43	58	WKGFNYESDSKRGFKD	16
	3	61	78	DRILKETNEYRAAHDAPK	18
	4	84	130	ALAQAQAYAEHLAKIEKMHVDPDPTNHKLFIGNLAVASPSIAHIGVK	47
	5	139	141	YNF	3
	6	148	178	KATAHFTQLIWKGSSKIGCGIGVSTRVYTV	31
	7	180	180	K	1
	8	182	197	SPAGNLDNEYEKNVSP	16
CAP A0A0K0FX99	1	5	41	IFSAFLIITLIGVSCLSYVQSSVFKGKIELSNKVFEK	37
	2	43	78	WKGFNYESDSKSGFKDMKDRILKESNEYRAAHDAPK	36
	3	84	130	ALAQAQAVYAEHLAKIGKMEHDPTNHKLFIGNLAVASPSIAHIGVK	47
	4	139	142	YNFN	4
	5	148	178	KATAHFTQLIWKGSSKIGCGIGVSTRVYTV	31
	6	180	180	K	1
	7	182	197	SPAGNLDNEYEKNVSP	16
Não caracterizada A0A0K0F262	1	5	27	VKDSSVKTAYDELHNKHMHSFL	23
	2	33	94	DDDTTIIVEKKGDGKAPYSEFVDSMKDCVGGGKECRYAAVDVEVT VQRQGAEGASKLSKIVF	62
	3	104	149	VRRRMLYASSVRALKATLGLESLMQVQASDLSIDIDEKAIKHELMSS	46

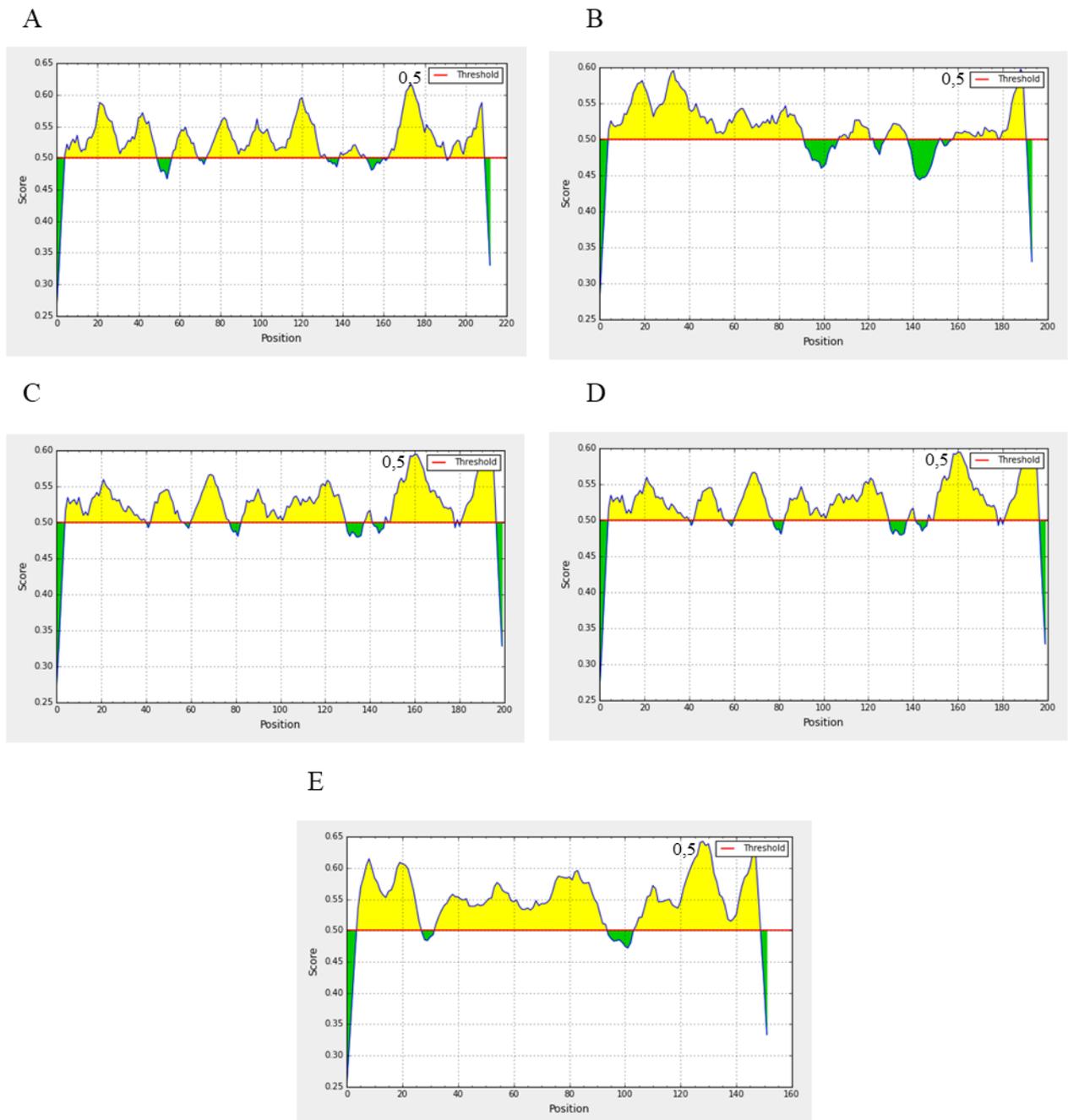


Figura 13. Predição de epítomos de célula B lineares pelo software Bepipred 2.0 obtido pela plataforma *Immune Epitope Database* (IEDB) (<http://www.iedb.org/>). (A) Proteína A0A0K0FJA1 – Proteína contendo domínio CAP - Família CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) - proteína identificada nas três preparações (TS, RPMI E/S e PBS E/S), (B) Proteína A0A0K0FHM6 – Proteína ligante de cálcio* AT09395p - proteína identificada no extrato Total Salino –TS, (C) Proteína A0A0K0F4S7 – Proteína contendo domínio CAP* - Família CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) identificada no produto RPMI E/S, (D) Proteína A0A0K0FX99 – Proteína contendo domínio CAP* - Família CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) identificada no produto RPMI E/S e (E) Proteína A0A0K0F262 – Proteína não caracterizada – ligação/despolimerização de actina identificada no produto PBS E/S. Picos em amarelo representam aminoácidos com escores acima do *threshold* e em verde abaixo.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, os produtos de excreção e secreção de larvas filarioides de *S. venezuelensis* foram aplicados aos testes diagnósticos, para detecção de IgG em amostras de soro de ratos e de humanos, e suas proteínas imunorreativas foram caracterizadas por espectrometria de massas e análise de bioinformática. Os produtos de excreção/secreção de parasitos podem apresentar-se como ferramentas promissoras no desenvolvimento de testes diagnósticos. Pesquisa com antígenos de E/S de *Toxocara canis* foram aplicados em dot-ELISA e ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. canis* e apresentaram bons resultados na detecção, demonstrando que produtos de E/S de parasitos são estáveis, fáceis de utilizar e de baixo custo (CAMARGO et al., 1992).

A obtenção de produtos de E/S de parasitos são realizados por meio de cultura “in vitro”. O período de sobrevivência das larvas filarioides de *S. venezuelensis* em cultura, determinado pela diminuição da motilidade das larvas no meio, variaram entre 24 h e 120 h para aquelas mantidas em meio RPMI e de 24 a 72 h para as mantidas em PBS. O maior período de sobrevivência das larvas no meio RPMI, possivelmente, ocorreu devido à presença de substratos orgânicos que aumentaram a sobrevivência das larvas. Assim, o tempo de cultura das larvas para produção de produtos de E/S foi padronizado para um período máximo de 72 h para ambas as preparações (RPMI e PBS). Estudos prévios, com diferentes espécies do gênero *Strongyloides* em cultura, apresentaram tempos de cultura semelhantes. Culturas de larvas filarioides de *S. stercoralis* na concentração de 50.000 a 100.000 larvas/mL de meio DMEM foram mantidas por um período de 24 h a 48 h (BRINDLEY et al., 1988). Em pesquisas nas quais as larvas foram mantidas em PBS, elas permaneceram viáveis por 6 h a uma concentração de 10.000 larvas/mL de meio (EL-BADRY, 2009). Experimentos que utilizaram larvas filarioides de *S. ratti*, mantiveram as culturas por 24 h a 72 h na concentração de 30.000 larvas/mL em meio RPMI 1640, suplementado com estreptomicina, penicilina e HEPES

(SOBLIK et al., 2011). Portanto, os tempos de sobrevivência dos parasitos em culturas podem variar, mesmo entre o mesmo gênero. As culturas não criam condições ambientais naturais, podendo afetar o padrão metabólico de E/S do parasito. Os métodos de produção e coleta de E/S dependem do parasito, seu ciclo de vida e de que maneira esses produtos de E/S são liberados (MARCILLA et al., 2012; WHITE; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2012).

O perfil eletroforético das preparações TS, RPMI E/S e PBS E/S demonstrou compartilhamento de algumas bandas proteicas. Acredita-se que este compartilhamento ocorra devido as larvas serem processadas em sua totalidade no TS, o que significaria que os produtos de E/S do parasito estejam presentes, embora os produtos de E/S em RPMI e PBS possam ser mais enriquecidos. A presença de frações proteicas exclusivas em cada preparado de E/S, possivelmente esteja relacionada ao meio de cultura utilizado. A liberação de diferentes proteínas pode ocorrer devido as diferenças de composição, pois o meio RPMI possui substâncias orgânicas que podem ser substrato para a síntese proteica das larvas, enquanto o PBS não possui.

Após a obtenção do extrato TS e os produtos RPMI E/S e PBS E/S, eles foram aplicados em testes imunodiagnósticos. Primeiramente realizados em amostras de soro de grupos experimentais para avaliar a capacidade dos preparados em detectar imunoglobulinas G. Os ratos infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* foram monitorados quanto ao estabelecimento da infecção. Após a infecção a contagem de OPG e de FP foi realizada no 8 dpi. O pico de infecção observado está de acordo com a literatura. Nakai e Amarante (2001) ao comparar a infecção experimental com *S. venezuelensis* em ratos e camundongos, observaram pico de eliminação de ovos para ratos entre 7-8 dpi, enquanto o pico em camundongos ocorreu entre 6-7 dpi. Gonçalves e colaboradores (2012c), em estudo que avaliou a detecção de antígeno, anticorpos e imunocomplexos no soro de ratos experimentalmente infectados, durante a monitoramento da infecção observaram pico de liberação de ovos no 8 dpi. Neste mesmo

estudo os valores de OPG apresentavam-se mais elevados para o grupo imunossuprimidos comparado ao grupo selvagem, concordando com nossos resultados. Relativo à contagem de FP nossos achados mostraram padrão semelhante aos anteriormente descritos, ou seja, valores maiores para o grupo IS+ em relação ao grupo IC+. Machado e colaboradores (2011b), ao analisarem os efeitos da dexametasona sobre a infecção por *S. venezuelensis* em ratos, observaram uma maior presença de FP no grupo imunossuprimido como também maior contagem de OPG. O estudo sugeriu que o aumento está relacionado a ação da dexametasona que teria promovido um aumento da fecundidade das FP, da liberação de ovos férteis e conseqüentemente o aumento da carga parasitária.

No ensaio ELISA com soros de ratos, todas as preparações foram capazes de detectar IgG anti-*S. venezuelensis*. RPMI E/S e PBS E/S apresentaram melhores resultados, quando comparado ao TS. Não houve diferença estatística na detecção de IgG anti-*Strongyloides* na presença de condições imunossupressoras (IC+ vs. IS+) para todas as preparações. Nos parâmetros diagnósticos, os produtos RPMI E/S e PBS E/S apresentaram melhor desempenho diagnóstico, com destaque para o RPMI E/S com as maiores porcentagens para cada parâmetros analisados. Gonçalves et al. (2012c), utilizando extrato alcalino de *S. venezuelensis*, destacaram bons resultado, assim como os dados aqui apresentados, na detecção de IgG em amostras de soro de ratos experimentalmente infectados e imunossuprimidos quando comparados com a detecção de antígenos circulantes sanguíneos. Uma pesquisa que analisou a detecção de anticorpos, por ELISA, após infecção experimental em ratos por um período de 60 dias, demonstrou que a detecção de IgG teve início no 5 dpi, atingindo pico de detecção no 28 dpi e com queda a partir do 35 dpi (MARQUES et al. 2016). Os resultados deste último estudo contrastaram com dados apresentados na literatura, cujo pico de detecção de IgG ocorre entre 7-8 dpi em animais imunossuprimidos e imunocompetentes (MACHADO et al., 2011b; GONÇALVES et al. 2012c).

Proteínas de E/S de diferentes estágios de *S. ratti*, considerado geneticamente similar a *S. stercoralis*, já foram descritas. Alguns estudos, com o objetivo de identificar o secretoma e o proteoma das diferentes formas evolutivas de *S. ratti*, encontraram 586 proteínas diferentes. Tais proteínas foram aplicadas na detecção de imunoglobulina anti-*S. ratti* em soro de ratos infectados e apresentaram resultados satisfatórios (SOBLIK et al., 2011). Proteínas de choque térmico (Sra-HSP-17.1 e Sra-HSP-17.2) de *S. ratti* identificadas nos produtos de E/S de FP, foram usadas para imunização de ratos em ensaios celulares e outras análises funcionais. As proteínas HSP, demonstraram ser imunogênicas por ativarem a produção de anticorpos IgG em ratos infectados com *S. ratti*, após repetida imunização (YOUNIS et al., 2011).

Após a análise da detecção de IgG em amostras de soro de ratos infectados os produtos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (TS, RPMI E/S e PBS E/S) foram aplicados para teste imunodiagnóstico em amostras de soro humano. No ELISA de detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro humano, igualmente ao ocorrido nos testes experimentais, todas as preparações detectaram satisfatoriamente o anticorpo. O preparado PBS E/S apresentou melhores resultados, reduzindo o número de falsos positivo no grupo OP, quando comparado ao extrato TS e preparado RPMI E/S. Quanto aos parâmetros diagnósticos, o preparado PBS E/S, também apresentou melhores resultados. Semelhante aos dados aqui apresentados, pesquisa utilizando produtos de E/S de larvas filarioides de *Anisakis simplex*, produzidos em meio RPMI e PBS, foram aplicados em testes para detecção de IgG e o antígeno obtido em PBS apresentou melhores resultados comparado ao meio RPMI (HWANG et al., 2003). Em um estudo com pacientes imunossuprimidos, utilizando o antígeno bruto e suas outras frações no diagnóstico sorológico da estrogiloidiase humana, o antígeno bruto apresentou sensibilidade e especificidade relativamente baixas no teste ELISA (SILVA et al., 2014). Assim, ainda não foi possível obter um preparado E/S que apresente dados diferentes o suficiente que justifiquem a preparação em condições imunossupressoras.

A pesquisa de frações imunorreativas por IgG presente em amostras de soro humano foi realizado por *Immunoblotting* 1D. As três preparações (TS, RPMI E/S e PBS E/S) apresentaram reconhecimento de específico da banda proteica de aproximadamente 17 kDa, ou seja, marcada apenas nos grupos positivos. Em estudo anterior, Carvalho e colaboradores (2015), ao compararem a detecção de IgG anti-*S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos utilizando antígenos alcalinos produzidos a partir de três formas evolutivas (larva filarioide, FP e ovo), observaram que frações proteicas de 17 kDa presente no antígeno alcalino de larvas filarioides apresentavam detecção de IgG a partir do 5 dpi. sendo uma banda específica.

As bandas proteicas imunorreativas específicas (17kDa) foram analisadas por espectrometria de massas. As proteínas que apresentaram maior *score* e cobertura, foram selecionadas e por meio do código de acesso, o código FASTA de cada uma das proteínas foi obtido e aplicados na construção dos modelos tridimensionais, da análise de peptídeo de sinal e da predição de epítomos de célula B.

Das cinco proteínas identificadas, três constituem proteínas contendo domínio CAP (A0A0K0FJA1, A0A0K0F4S7, A0A0K0FX99), uma proteína ligante de cálcio *EF-hand* (A0A0K0FHM6) e outra não caracterizada (A0A0K0F262), porém semelhante a proteínas de ligação/despolimerização de actina, pertencente à família Fator de despolimerização de actina/cofilina (*Actin Depolymerization Factor-ADF/Cofilin*).

A superfamília de proteínas CAP (*Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins*) também chamada de *Sperm-Coating Protein/Tpx/Antigen 5/Pathogenesis-related-1/Sc7* (SCP/TAPS) ocorre em produtos de E/S de várias espécies de helmintos que parasitam plantas e animais. Embora uma nomenclatura uniforme tenha sido proposta anteriormente, proteínas CAP de helmintos ainda apresentam nomes diferenciados, incluindo *Activation-associated Secreted Proteins* (ASPs) ou mais comumente chamada de *Venom Allergen-Like Proteins* (VALs or VAPs) (CANTACESSI et al., 2009; CANTACESSI;

GASSER, 2012; WILBERS et al., 2018). Nenhum clado separado de VALs exclusivamente associado ao parasitismo está presente entre os nematóides, isto é, não há distinção entre as VALs dos nematóides parasitos e os de vida livre. No entanto, há uma grande diferença no número de VALs presentes em genomas de nematóides, variando de alguns (*H. aoronymphium*, *Brugia malayi*) a mais de 100 (*Ancylostoma caninum*) (WILBERS et al., 2018), o que as tornam possíveis alvos de diagnóstico e vacinais.

Na ordem Strongylida, as ASPs foram relatadas pela primeira vez para *A. caninum*. Uma ASP de domínio SCP duplo, denominado Ac-ASP-1, foi identificada como um componente predominante dos produtos de E/S de larvas L3 infectantes ativadas por soro. Evidências indicaram que estas moléculas são produzidas e liberadas, após um estímulo específico do hospedeiro no processo de infecção (HAWDON et al. 1996). Outro ASP de domínio SCP tipo C, chamado Ac-ASP-2, também foi caracterizado como um dos principais componentes dos produtos de E/S a partir de L3s ativadas de *Ancylostoma* (HAWDON et al., 1999) e estão localizados principalmente em grânulos no esôfago glandular, sugerindo que seja secretado por *A. caninum*, ao penetrar o seu hospedeiro (BETHONY et al., 2005; CANTACESSI ; GASSER, 2012). A identificação de proteínas com domínio CAP nos preparados RPMI E/S e PBS E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, sugere que o parasito utiliza o mesmo mecanismo para evadir da resposta imune do hospedeiro. Possivelmente essas proteínas presentes na excreção/secreção do parasito, desempenham papel similar, como também possam estar presentes no esôfago do parasito, uma vez que o mecanismo de infecção do *Strongyloides* é semelhante ao dos Ancylostomatídeos.

A análise de transcriptoma a partir de quatro estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis*, identificou dois genes altamente expressos na fase larval L3. Esses genes codificam enzimas envolvidas nas reações biossintéticas de glicano (fosfomanomutase, alfa-manosidase). Os helmintos parasitos, incluindo nematóides, liberam numerosos tipos de

proteínas no ambiente hospedeiro, especialmente as glicoproteínas. Como PAMPS (*molecular patterns associated with pathogens*), as glicoproteínas interagem com receptores de reconhecimento de padrão inatos (PRR), tipo *Toll-like* e lectinas C nas células dendríticas do hospedeiro (NAGAYASU et al., 2013).

O *EF-hand* é um domínio estrutural de ligação (hélice-loop-hélice), encontrado em proteínas ligantes de cálcio (GRABAREK, 2006). No presente estudo, foi identificado no extrato TS de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, uma proteína com tal característica.

Poucas proteínas com domínios *EF-hand*, secretadas pelas células, tem seus papéis críticos ocorrendo extracelularmente (BIANCHI et al., 2011), como o que ocorre com a longistatina, uma proteína *EF-hand* ligante de cálcio descoberta na glândula salivar de carrapatos *Haemaphysalis longicornis*, ligada ao processo de alimentação (ANISUZZAMAN et al., 2010). Tsubokawa e colaboradores (2017), identificaram e caracterizaram uma proteína *EF-hand* ligante de cálcio de *S. venezuelensis* denominada venestatina. Essa proteína é altamente conservada no gênero *Strongyloides* e apresenta dois domínios *EF-hand* com pequeno peptídeo sinal. A venestatina endógena foi identificada na hipoderme do parasito e no intestino, em produtos de excreção/secreção e foi utilizada para produção de soro em camundongos, e interferiu com a migração larval da pele para o pulmão dos camundongos (TSUBOKAWA et al. 2017).

Embora identificada no TS e nos produtos de E/S, a proteína não mostrou sequência de possível peptídeo sinal, comumente associado ao sistema de organelas (para modificações pós-traducionais), seguida de secreção. A caracterização completa da proteína ligante de cálcio certamente contribuirá para o entendimento das funções dela no parasito e na relação como o hospedeiro.

No preparado E/S PBS, foi identificada uma proteína não caracterizada, porém semelhante as proteínas ADF/Cofilin. A família de proteínas ADF/Cofilin, é composta por

proteínas conservadas que apresentam massa molecular baixa (15-22 kDa) e tem atividades relacionadas a actina, isto é, desestabilizam os filamentos de actina e, conseqüentemente, aumentam a quantidade de actina monomérica. Representantes da família ADF/Cofilin foram identificados independentemente em vários organismos e todas as células eucarióticas têm pelo menos uma proteína ADF/Cofilin (MOON; DRUBIN, 1995; LAPPALAINEN; DRUBIN, 1997; YDENBERG et al. 2015).

Em recente pesquisa na qual buscavam identificar proteínas que induziam intoxicação alimentar após o consumo de carne de cavalo crua, constataram que amostras as de carne de cavalo estavam infectadas com *Sarcocystis fayeri*. Dos cistos de *S. fayeri* isolaram uma proteína de 15 kDa que possui atividade indutora de diarreia. A análise do cDNA da proteína de 15 kDa por PCR demonstrou homologia com o fator de despolimerização de actina (ADF) indicando que a proteína de 15 kDa de *S. fayeri* pertencia à família de proteínas ADF/Cofilin. Ao produzirem a proteína 15-kDa de forma recombinante e aplicarem-na nos testes em animais, a proteína provocou acúmulo de fluido no íleo, resultando em diarreia, porém *in vitro* não provocou a morte de células fibroblásticas, macrófagos ou células da mucosa intestinal. Ao utilizar o sobrenadante da cultura dos macrófagos tratados com a proteína recombinante de 15 kDa em culturas de fibroblastos L929, a adição do sobrenadante provocou a morte das células. Este fato indica que o ADF de *S. fayeri* induziu a liberação de substâncias citotóxicas, como o fator de necrose tumoral α nas células (IRIKURA et al., 2017).

Esses dados indicam que proteínas dessa família tem papel na manutenção do ciclo de parasitos intestinais. A identificação de proteínas como marcadoras de infecção por *Strongyloides*, sugere que, mesmo conservadas, pode ser reconhecida por anticorpos IgG em parasitos do mesmo gênero com ciclos intestinais distintos. A infecção produzida pelo *S. venezuelensis* em ratos, apresenta liberação de ovos nas fezes, enquanto a infecção por *S. stercoralis*, em humanos, o indivíduo infectado libera larvas rabditoides.

A avaliação da modelagem tridimensional de proteína avaliou a presença de peptídeo sinal como outras características inerente às proteínas. Análises obtidas pelo servidor SignalIP 1.4 demonstraram região equivalente a possível presença de peptídeo sinal em três proteínas. Peptídeos sinal correspondem à região onde proteínas são clivadas durante seu processo de translocação através da membrana do retículo endoplasmático em eucariotas e da membrana citoplasmática em procariontes (PETERSEN et al., 2011). Essa análise é importante pois a clivagem da proteína na região do peptídeo de interesse invalidaria sua utilização no desenvolvimento de proteínas recombinantes e antígenos vacinais. No presente estudo, as proteínas contendo domínio CAP, apresentaram peptídeo sinal em sua região N-terminal, cuja sequência, coincide com a sequência predita para epítomos de célula B. Enquanto as proteínas *EF-hand* ligante de cálcio e a proteína não-caracterizada com similaridade a proteínas ADF/Cofilin, não apresentaram peptídeo sinal, podendo dessa forma, utilizar todas as sequências preditas para epítomos de célula B. Essa análise, possivelmente auxiliara na construção de recombinantes ou sintéticos que auxiliaram na produção de ferramentas diagnósticas como também possíveis alvos vacinais.

Neste estudo, a modelagem da estrutura terciária foi realizada pelo servidor *online* I-TASSER e a validação dos mesmos pelo programa VERIFY 3D. Todas proteínas identificadas, obtiveram valores acima de 80% na validação da estrutura 3D, exceto a proteína contendo domínio CAP - A0A0K0FX99, que não atingiu a porcentagem necessária. Em alguns casos, cerca de 27% de identidade entre as sequências é suficiente para um bom alinhamento e, conseqüentemente, para um bom modelo. Há casos, porém, em que apesar do alto grau de identidade e do bom alinhamento não se obtém modelos satisfatórios. Cada modelagem é um problema particular e deve-se ter sempre em mente que a construção de um modelo de proteína é uma tarefa que deve ser fundamentada em princípios de evolução molecular para cada grupo específico de proteínas homólogas. Quando as proteínas têm vários domínios, a construção do

modelo é um processo ainda mais complexo (SANTOS FILHO, ALENCASTRO, 2003). Nesse sentido, em pesquisas futuras, seria interessante a escolha de proteínas identificadas e com modelos 3D confiáveis.

A predição de epítomos de células B é importante para determinar e caracterizar os epítomos capazes de ativar a resposta imune mediada por anticorpos. O objetivo principal da predição é projetar/identificar uma molécula que possa substituir o antígeno no processo de produção ou detecção de anticorpos, uma vez que essas moléculas podem ser sintetizadas ou no caso de proteínas, podem ser clonadas em um vetor de expressão (PONOMARENKO, Van REGENMORTEL, 2009). As células B são consideradas um componente central do sistema imune adaptativo, pois têm a capacidade de reconhecer e fornecer proteção de longo prazo contra patógenos infecciosos ou células cancerígenas. Eles realizam essas funções produzindo anticorpos, proteínas que são secretadas ou expressas na superfície das células B e que reconhecem seu alvo molecular (chamado antígeno) ligando-se a uma parte dele (chamada epítomo) de uma maneira altamente seletiva (JESPERSEN et al., 2017). Epítomos de células B podem ser divididos em dois grupos: os epítomos lineares são formados por trechos lineares de resíduos na sequência proteica do antígeno (KRINGELUM et al., 2013).

As ferramentas confiáveis de predição de epítomos de células B são de importância fundamental em muitas aplicações clínicas e biotecnológicas, como o design de vacinas e o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos como também para nossa compreensão geral do sistema imunológico (EL-MANZALAWY; HONAVAR, 2010; SHIRAI et al. 2014). Em nosso estudo a avaliação da predição de epítomos de célula B, pelo Bepipred 2.0, demonstrou que as proteínas apresentaram sequências preditas como possíveis epítomos para células B. Esses dados demonstram, que apesar de muitas proteínas serem conservadas, possuem regiões com sequências de aminoácidos com potencial antigênico, podendo ser aplicados na construção de

peptídeos miméticos, vacinais ou sintéticos, aplicáveis tanto com ferramentas diagnósticas como potenciais vacinais.

As características imunogênicas dos antígenos proteicos, em especial os de E/S, puderam ser explorados na busca por diagnósticos mais específicos para estrogiloidíase. A aplicação dos produtos de E/S de larvas filarioides de *S. venezuelensis* no imunodiagnóstico e a caracterização das proteínas imunorreativas podem fornecer informações importantes como quais proteínas são indutoras de resposta imune com especificidade contra o parasito. O reconhecimento dessas proteínas presentes nos produtos de E/S podem auxiliar no desenvolvimento de novos alvos diagnósticos e vacinais para a estrogiloidíase.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Os produtos E/S de *S. venezuelensis* apresentaram bom desempenho na detecção de IgG anti-*Strongyloides*, tanto na estrogiloidiase experimental, quanto na humana.
- ✓ Nos parâmetros diagnósticos os produtos RPMI E/S e PBS E/S apresentaram melhores resultados que o extrato TS, nos grupos experimentais e humanos.
- ✓ As três preparações de larvas de *S. venezuelensis* (extrato TS, RPMI E/S e PBS E/S) compartilharam bandas proteicas tanto no perfil eletroforético, quanto no *immunoblotting*, e tiveram reconhecimento específico de IgG humana por bandas proteicas de 17 kDa.
- ✓ As proteínas imunorreativas identificadas são em sua maioria proteínas de E/S pertencente à família CRISP com domínio CAP, sendo uma delas compartilhada entre as três preparações (TS, RPMI E/S e PBS E/S).
- ✓ A construção dos modelos tridimensionais das proteínas e suas validações foram satisfatórias e permitiram entender como essas proteínas apresentam sua conformação.
- ✓ A predição de epítopos de célula B, pelo programa Bepipred 2.0, identificou sequências preditas como epítopos de célula B, podendo serem utilizadas como possíveis ferramentas diagnósticas, como também em testes vacinais.

REFERÊNCIAS

- ANISUZZAMAN, I. M.K.; MIYOSHI, T.; ALIM, M.A.; HATTA, T.; YAMAJI, K.; MATSUMOTO, Y.; FUJISAKI, K.; TSUJI, N. Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is required for acquisition of host blood-meals. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 721-729, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.004>
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Systemic cytokine profiles in *Strongyloides stercoralis* infection and alterations following treatment. **Infection and Immunity**, v. 84, p.425-431, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.01354-15>
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. IL-10-and TGFbeta-mediated Th9 responses in a human helminth infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10 (1):e0004317, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004317>
- ASHFORD, R.W.; BARNISH, G.B. *Strongyloides fuelleborni* and similar parasites in animals. In: **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**, D.I. GROVE, ed. (London: Taylor and Francis), 1989, p. 271-286.
- ASHFORD, R.W.; BARNISH, G.; VINEY, M.E. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: Infection and disease in Papua New Guinea. **Parasitology**, v. 8, p. 314-318, 1992. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90106-C](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90106-C)
- BAERMANN, G. Eine Einfache Metrode zur Auffindung von *Ankylostomum* (Nematoden) – Larven in Erdproben. **Mededeel mit. H. Geneesk Batavia: Lab. Weltevreden. Feestbundel**, p.41-47, 1917.
- BAVAY, A. Sur l'Anguillule stercorale. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de L'académie des sciences Biologie**, v. 83, p.694–696, 1876.
- BETHONY, J.; LOUKAS, A.; SMOUT, M.; BROOKER, S.; MENDEZ, S.; PLIESKATT, J.; GOUD, G.; BOTTAZZI, M.E.; ZHAN, B.; WANG, Y.; WILLIAMSON, A.; LUSTIGMAN, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; XIAO, S.; HOTEZ, P. J. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. **FASEB Journal**, v. 19, p. 1743-1745, 2005. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3936fje>
- BIANCHI, R.; KASTRISIANAKI, E.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 7214-7226, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169342>
- BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid

enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1716-1719, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02364-09>

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELMI, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.129-133, 2007. <https://doi.org/10.1128/CVI.00278-06>

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L. L.; SEET, R. C. S.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians in training survey. **American Journal of Medicine**, v.120, p. 545-551, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.05.072>

BOWIE, J.U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, p.164-170, 1991. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>

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>

BRINDLEY, P.J.; GAM, A.A.; PEARCE, E.J.; POINDEXTER, R.W.; NEVA, F.A. Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 28, p. 171-180, 1988. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90001-1)

BUONFRATE, D.; MENA, M. A.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; ALBONICO, M.; GOTUZZO, E.; BISOFFI, Z.; COHEMI Project Study Group. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. **Epidemiology & Infection**, v. 143, p. 452-460, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001563>

CAMARGO, E.D.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J.; SILVA, M.V.; CHIEFFI, P.P.; DE MELO, E.O. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, p. 55-60, 1992. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651992000100010>

CANTACESSI, C.; GASSER, R.B. SCP/TAPS proteins in helminths - Where to from now? **Molecular and Cellular Probes**, v. 26, p. 54-59, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.10.001>

CANTACESSI, C.; CAMPBELL, B.E.; VISSER, A.; GELDHOF, P.; NOLAN, M.J.; NISBET, A.J.; MATTHEWS, J.B.; LOUKAS, A.; HOFMANN, A.; OTRANTO, D.; STERNBERG, P.W.; GASSER, R.B. A portrait of the “SCP/TAPS” proteins of eukaryotes -

Developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes.

Biotechnology Advances, v.27, p.376-388, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.02.005>

CARVALHO, E.F.G.; NETO DE SOUZA, J.E.; GONÇALVES, A.L.R.; CUNHA-JUNIOR, J.P.; COSTA-CRUZ, J.M. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, parthenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 157, 117-123, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.07.009>

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

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>

<https://doi.org/10.1590/S0036-46651998000500013>

CROWE, J.; LUMB, F.E.; HARNETT, M.M.; HARNETT, W. Parasite excretory-secretory products and their effects on metabolic syndrome. **Parasite Immunology**, v. 39, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1111/pim.12410>

DE PAULA, F. M.; CASTRO, E. D.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M.G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, p.51-55, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652000000100009>

DONG, W.H.; WANG, T.Y.; WANG, F.; ZHANG, J.H. Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue. **PLoS One**, v. 6, e22394, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022394>

EL-BADRY, A.A. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39 p. 427-468, 2009.

EL-MANZALAWY, Y.; HONAVAR, V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. **Immunome Research**, v. 6 (Suppl 2): S2, 2010. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-S2-S2>

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, p.18-27, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.016>

FAUST, E. C.; SWITZ, W.; TOBIE, J. Comparative efficiency of various techniques for diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241-262, 1939. <https://doi.org/10.2307/3272508>

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrofobic 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. S.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; GONZAGA, H. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2792, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002792>

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

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.022>

FOGAÇA, H.S.; ELIA, C.C.S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrogiloidíase. **Folha Médica**, v. 101, p. 229-235, 1990.

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

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90525-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90525-5)

GANESH, S.; CRUZ-Jr, R. J. Strongyloidiasis: A multifaceted disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 194-196, 2011.

GASSMANN, M.; GRENACHER, B.; ROHDE, B.; VOGEL, J. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1845-1855, 2009.

<https://doi.org/10.1002/elps.200800720>

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.

<https://doi.org/10.1093/clinids/11.5.755>

GENTA, R. M. Strongyloidiasis. **Encyclopedia of Immunology**, 2nd edition, Ed. Elsevier, 2004, p. 2238-2239.

<https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0565>

GEORGE, P.J.; ANURADHA, R.; KUMAR, N.P.; SRIDHAR, R.; BANUREKHA, V.V.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit mono- and multifunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in a process dependent on IL-10. **PLoS Pathogens**. v. 10, e1004375, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004375>

GOMPELS, M.; TADOL, J.; PETERS, B. S.; PINCHING, A. J. Disseminated strongyloidiasis in AIDS: uncommon but important. **AIDS**, v. 5, p. 329-332, 1991.

<https://doi.org/10.1097/00002030-199103000-00015>

GONÇALVES, A.L.R.; RODRIGUES, R.M.; SILVA, N.M.; GONÇALVES, F.A.; CARDOSO, C.R.; BELETTI, M.E.; UETA, M.T.; SILVA, J.S.; COSTA-CRUZ, J.M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 319-328, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.023>

GONÇALVES, A. L. R., 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.166-169, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.010>

GONÇALVES, A. L. R.; ROCHA, C. A.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 79-84, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.011>

GONÇALVES, A. L. R., SILVA, C.V., UETA, M.T., COSTA-CRUZ, J.M. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Experimental Parasitology**, v.130, p. 205-208, 2012c. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.007>

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 78-84, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.016>

GONZAGA, H.T.; VILA-VERDE, C.; NUNES, D.S.; RIBEIRO, V.S.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; COSTA-CRUZ, J.M. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 140 (01), p. 69-75, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001230>

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

GRABAREK, Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, p. 509–525, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.066>

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-309, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)

GREINER, M.; SOHR, P.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.85, p.123-132, 1995.

HARNETT, W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, p. 130-136, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.007>

HAWDON, J.M.; JONES, B.F.; HOFFMAN, D.R.; HOTEZ, P.J. Cloning and characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p. 6672-6678, 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.6672>

HAWDON, J.M.; NARASIMHAN, S.; HOTEZ, P.J. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.99, p.149-165, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00011-0)

HENDRIX, C. M; BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S. Whipworms and intestinal threadworms. **Veterinary Clinics of North America**, v. 17, p. 1366-1373, 1987.

[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(87\)50006-7](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(87)50006-7)

HINO, A.; TANAKA, T.; TAKAISHI, M.; FUJII, Y.; PALOMARES-RIUS, J.E.; HASEGAWA, K.; MARUYAMA, H.; KIKUCHI, T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 141, p. 1736-1745, 2014.

<https://doi.org/10.1017/S0031182014001036>

HIRA, P.R.; PATEL, B.G. Human strongyloidiasis due to the primate species *Strongyloides fuelleborni*. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 32, p. 23-29, 1980.

HIRA, P.R.; AL-ALI, F.; SHWEIKI, H. M.; ABDELLA, N. A.; JOHNY, M.; FRANCIS, I.; IQBAL, J.; THOMPSON, R.; NEVA, F. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Annual of Tropical Medicine Parasitology**, v.98, p. 261-270, 2004. <https://doi.org/10.1179/000349804225003299>

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis *mansoni*. Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

HWANG, Y.K.; KIM, J.S.; LEE, J.B.; SONG, T.J.; JOO, K.W.; LEE, J-S.; CHO, S-W. human anisakiasis: diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions/secretions. **Parasite Immunology**, v. 25 p. 1-7, 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00493.x>

INÊS, E.J.; SOUZA, J.N.; SANTOS, R.C.; SOUZA, E.S.; SANTOS, F.L.; SILVA, M.L.S.; SILVA, M.P.; TEIXEIRA, M.C.A.; SOARES, N.M. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, v. 120, p. 206-210, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.010>

IRIEMENAM, N. C.; SANYAOLU, A. O.; OYIBO, W. A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A. F. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v.59, p. 9-14, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.009>

- IRIKURA, D.; SAITO, M.; SUGITA-KONISHI, Y.; OHNISHI, T.; SUGIYAMA, K.I.; WATANABE, M.; YAMAZAKI, A.; IZUMIYAMA, S.; SATO, H.; KIMURA, Y.; DOI, R.; KAMATA, Y. Characterization of *Sarcocystis fayeri's* actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea. **Genes to Cells**, v.22, p. 825-835, 2017.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12515>
- JESPERSEN, M.C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p.24-29, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- KEISER, P.B., NUTMAN, T.B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p. 208-217, 2004.
<https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>
- KRAMME, S., NISSEN, N., SOBLIK, H., ERTTMANN, K., TANNICH, E., FLEISCHER, B., PANNING, M., BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides species*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 454-458, 2011.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.025338-0>
- KRINGELUM, J.V.; NIELSEN, M.; PADKJÆR, S.B.; LUND, O. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 24-34, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.06.001>
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LAPPALAINEN, P.; DRUBIN, D.G. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. **Nature**, v.388, p. 78-82, 1997. <https://doi.org/10.1038/40418>
- LAWRENCE, A.M.; BESIR, H.U. Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. **Journal of Visualized Experiments**, 2009.
<https://doi.org/10.3791/1350>
- 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>
- LEVINE, N.D. Nematode parasites of domestic animals and of man. **Minnesota: Burgess Publishing Company**, 1980, 477 p.
- LINDO, J. F.; COWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting methods for diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175-179, 1994.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.175>
- LIU, L.X.; WELLER, P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v.37, p. 655-682, 1993.

LOK, J. B.; SHAO, H.; MASSEY Jr., H. C.; LI, X. Transgenesis in *Strongyloides* and related parasitic nematodes: historical perspectives, current functional genomic applications and progress towards gene disruption and editing. **Parasitology**, v.144, p. 327-342, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000391>

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 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. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600024>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; FACCIOLI, L. H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, v.29, p.549-557, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00974.x>

MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: The antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7-14, 2008a. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.008>

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. LOUREIRO, Z. M.; ARAÚJO, R. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2008b. <https://doi.org/10.1080/00365540701558730>

MACHADO, E. R.; CARLOS, D.; LOURENÇO, E. V.; SORGI, C. A.; SILVA, E. V.; RAMOS, S. G.; UETA, M. T.; ARONOFF, D. M.; FACCIOLI, L. H. Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 571-578, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.005>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANÍBAL, F. F.; SILVA, E. V. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COSTA-CRUZ, J. M.; FACCIOLI, L. H. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 72-79, 2011a. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.027>

MACHADO, E.R.; CARLOS, D; SORGI, C.A.; RAMOS, S.G.; SOUZA, D.I.; SOARES, E.G.; COSTA-CRUZ, J.M.; UETA, M.T.; ARONOFF, D.M.; FACCIOLI, L.H. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.84, p. 957-966, 2011b.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0490>

MAHMOUD, A.A.F. Strongyloidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 949-952, 1996. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.5.949>

MAIA, T.M.C.; VASCONCELOS, P.R.L.; FAUTH, S.; MOTTA NETO, R. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 19, p. 118-121, 2006. <https://doi.org/10.5020/18061230.2006.p118>

MARCILLA, A.; TRELIS, M.; CORTÉS, A.; SOTILLO, J.; CANTALAPIEDRA, F.; MINGUEZ, M.T.; VALERO, M.L.; DEL PINO, M.M.S.; MUÑOZ-ANTOLI, M.; TOLEDO, R.; BERNAL, D. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. **PLoS One**, v.7, e45974, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045974>

MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H.L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p. 314-318, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.020>

MARQUES, P.D.; MALTA, F.M.; MEISEL, D.M.C.L.; CORRAL, M.A.; PINHO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C.B.; 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. P.; ZORNELLA-EZAVENTO, 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>

MASCARELLO, M., GOBBI, F., ANGHEBEN, A., GOBBO, M., GAIERA, G., PEGORARO, M., LANZAFAME, M., BUONFRATE, D., CONCIA, E.; BISOFFI, Z. Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among HIV-positive immigrants attending two Italian hospitals, from 2000 to 2009. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.105, p.617–623, 2011. <https://doi.org/10.1179/2047773211Y.0000000006>

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

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005, 273p.

MOON, A.; DRUBIN, D.G. The ADF/Cofilin Proteins: Stimulus-responsive modulators of Actin dynamics. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, p. 1423-1431, 1995.

<https://doi.org/10.1091/mbc.6.11.1423>

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.

MUKERJEE, C. M.; CARRICK, J.; WALKER, J. C.; WOODS, R. L. Pulmonary strongyloidiasis presenting as chronic bronchitis leadin to interlobular septal fibrosis and cured by treatment. **Respirology**, v. 8, p. 536-540, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00505.x>

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

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.006>

NAKAI, E.S.; AMARANTE, A.F.T. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, p. 1-6, 2001.

NCBI:txid6248 – Taxonomy Browser – *Strongyloides stercoralis*. Acesso: 31 de Jan. 2019. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SILVEIRA, M. R.; BORGES, C. M.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. **Infection and Immunity**, v.71, p.2607-2614, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2607-2614.2003>

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011. p. 523-527.

NOZAIS, J. P.; THELLIE, M.; DATRY, A.; DANIS, M. Disseminated strongyloidiasis. **Presse Medicine**, v. 30, p. 813-818, 2001. <https://doi.org/10.1177/0310057X0203000618>

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>

OLIVEIRA, L.C.M., RIBEIRO, C.T., MENDES, D.M., OLIVEIRA, T.C., COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 119-121, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100021>

PAGE, W.; JUDD, J.A.; BRADBURY, R.S. The unique life cycle of *Strongyloides stercoralis* and implications for public health action. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v.3, p.1-53, 2018. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020053>

PAMPIGLIONE, S.; RICCIARDI, M.L. Geographic distribution of *Strongyloides fuelleborni* in humans in tropical Africa. **Parasitology**, v. 14, p. 329–338, 1972.

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>

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJINE, G.; NILSEN, H.; SignalIP. 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

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

PONOMARENKO, J.V.; REGENMORTEL, M.H.V. Van. B-cell epitope prediction. In: GU, J.; BOURNE, P.E. (eds) **Structural bioinformatics**, 2ª ed. Wiley-Blackwell, New York, 2009, 879 p.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; CHIODINI, P.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; GOTUZZO, E.; MUÑOZ, J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2002, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>

RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; AMATO NETO, V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 648-653, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600017>

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.

RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1209–1214, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0602-z>

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v. 84, p. 50-53, 1998. <https://doi.org/10.1007/s004360050355>

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E.E.; TEIXEIRA, A. L.; BARROS-MAZON, S.; TREVISAN, R.C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 83-87, 1993. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821993000200003v>

ROXBY, A. C., GOTTLIEB, G. S.; LIMAVE, 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 nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.14, p.5-8, 1954.

SAFDAR, A.; MALATHUM, K.; RODRIGUEZ, S. J.; HUSNI, R.; ROLSTON, K. V. Strongyloidiasis in patients at comprehensive câncer center in the United States. **Cancer**, v.100, p.1531-1536, 2004. <https://doi.org/10.1002/cncr.20120>

SAID, T.; NAMPOORY, M. R. N.; NAIR, M. P.; HALIM, M. A.; SHETTY, S. A.; KUMAR, A. V.; MOKADAS, E.; ELSAYED, A.; JOHNY, K. V.; SAMHAN, M.; AL-MOUSAWI, M. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 1014-1015, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.03.047>

SALGAME, P.; YAP, G.S.; GAUSE, W.C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. **Nature Immunology**, v. 14, p.1118-1126, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2736>

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253–259, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000200019>

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **International 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)

SATO, Y.; INOUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 403-406, 1990. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90337-E](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90337-E)

SATO, Y., KOBAYASHI, J., SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651995000100006>

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>

SHERDING, R. G.; JOHNSON, S. E. **Doenças dos intestinos**. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. Roca. São Paulo, 1998. 771-803 p.

SHIRAI, H.; PRADES, C.; VITA, R.; MARCATILI, P.; POPOVIC, B.; XU, J.; OVERINGTON, J.P.; HIRAYAMA, K.; SOGA, S.; TSUNOYAMA, K.; DOMINIC, C.; LEFRANC, M.P.; IKEDA, K. Antibody informatics for drug discovery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**; v.1844, p. 2002-2015, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.07.006>

SIDDIQUI A. A.; BERK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 1040 –1047, 2001. <https://doi.org/10.1086/322707>

SIEGEL, M. O.; SIMON, G. L. Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1581, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001581>

SILVA, V. B. DA. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. 2007. 149 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SILVA, H.; DE CARVALHO, C.J.V.; LEVENHAGEN, M.A.; COSTA-CRUZ, J.M. The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. **Parasitology International**, v. 63, p. 790-793, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.005>

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>

SOBLIK, H.; YOUNIS, A. E.; MITREVA, M.; RENARD, B. Y.; KIRCHNER, M.; GEISINGER, F.; STEEN, H.; BRATTIG, N. W. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti* - Identification of stage-specific proteases. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.10, M111.010157, 2011. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010157>

SOPELETE, M. C. MÉTODOS DE ANÁLISE SOBRE DIAGNÓSTICO. In: MINEO, J. R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005, 203p.

SUDARSHI, S.; STÜMPFLE, R.; ARMSTRONG, M.; ELLMAN, T.; PARTON, S.; KRISHNAN, P.; CHIODINI, P. L.; WHITTY, C. J. M. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travelers compared with immigrants in a non-endemic country. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 728-732, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01069.x>

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M.; Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35 p. 173-184, 2006. <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i3.1876>

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 907-911, 1995. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00014-S](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00014-S)

TAZIR, Y.; STEISSLINGER, V.; SOBLIK, H.; YOUNIS, A. E.; BECKMANN, S.; GREVELDING, C. G.; STEEN, H.; BRATTIG, N. W.; AND ERTTMANN, K. D. Molecular and functional characterisation of the heat shock protein 10 of *Strongyloides ratti*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 149-157, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.07.007>

TOLEDO, R.; MUNOZ-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>

TOWBIN, H; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

TSUBOKAWA, D; HATTA, T.; KIKUCHI, T.; MAEDA, H.; MIKAMI, F.; ALIM, M.A.; MARUYAMA, H.; TSUJI, N. Venestatin, a Ca⁺⁺-binding protein from the parasitic nematode *Strongyloides venezuelensis*, is involved in the larval migration process. **International Journal for Parasitology**. v.47, p. 501-509, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.008>

VARATHARAJALU, R.; PARANDAMAN, V.; NDAO, M.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis* excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. **Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 115–122, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00289.x>

VERWEIJ, J. J., CANALES, M., POLMAN, K., ZIEM, J., BRIENEN, E.A., POLDERMAN, A. M., VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 342–346, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>

VINEY, M. *Strongyloides*. **Parasitology**, v. 144, p. 259-260, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001773>

VINEY, M.E.; LOK, J.B. **The biology of *Strongyloides* spp.** WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2015, p. 1-17. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>

VINEY, M.; KIKUCHI, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. **Parasitology**, v. 144, p. 285-294, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000020>

WALSON, J. L.; STEWART, B. T.; SANGARE, L.; MBOGO, L. W.; OTIENO, P. A.; PIPER, B. K.; RICHARDSON, B. A.; JOHN-STEWART, G. Prevalence and correlates of helminth co-infection in Kenyan HIV-1 infected adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e644, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000644>

WHITE, R.R.; ARTAVANIS-TSAKONAS, K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. **Virulence**, v.3 p.668-677, 2012. <https://doi.org/10.4161/viru.22832>

WILBERS, R.H.P.; SCHNEITER, R.; HOLTERMAN, M.H.M.; DRUREY, C.; SMANT, G.; ASOJO, O.A.; MAIZELS, R.M.; LOZANO-TORRES, J.L. Secreted venom allergen-like proteins of helminths: Conserved modulators of host responses in animals and plants. **PLoS Pathogens**, v.14, e1007300, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007300>

YDENBERG, C.A.; JOHNSTON, A.; WEINSTEIN, J.; BELLAVANCE, D.; JANSEN, S.; GOODE, B.L. Combinatorial genetic analysis of a network of actin disassembly-promoting factors. **Cytoskeleton**, v. 72, p. 349–361, 2015. <https://doi.org/10.1002/cm.21231>

YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 32-35, 1950. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3)

YOUNIS, A.E.; GEISINGER, F.; AJONINA-EKOTI, I.; SOBLIK, H.; STEEN, H.; MITREVA, M.; ERTTMANN, K.D.; PERBANDT, M.; LIEBAU, E.; BRATTIG, N.W. Stage-specific excretory/secretory small heat shock proteins from the parasitic nematode *Strongyloides ratti*: putative links to host's intestinal mucosal defense system. **FEBS Journal**, v. 278, p. 3319-3336, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08248.x>

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>