



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

Nágilla Daliane Feliciano

**Seleção e aplicação de peptídeos recombinantes e sintéticos
obtidos por *Phage display* no imunodiagnóstico da
estrongiloidíase humana**

**Uberlândia – MG
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

Nágilla Daliane Feliciano

**Seleção e aplicação de peptídeos recombinantes e sintéticos
obtidos por *Phage display* no imunodiagnóstico da
estrongiloidíase humana**

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

Prof.^a. Dra. Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
Coorientador

**Uberlândia – MG
2014**

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago

(A Jangada e a Pedra)

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico este trabalho em especial:

*Aos meus pais, Adão e Cleides;
Que são o meu exemplo de vida e a quem devo tudo o que hoje sou,
E com orgulho lhes agradeço imensamente;
Por todas as vezes que estiveram do meu lado;
Por toda a verdade em que me fizeram crer;
Por toda a alegria que trazem à minha vida;
Por todas as vezes em que eu estava errada e me tornaram certa;
Por cada sonho meu que transformaram em realidade;
Por todo o amor que neles encontrei.*

*Serei eternamente grata;
Vocês são quem me conhecem por dentro por inteiro;
Vocês são a minha força quando eu me sinto fraca;
Vocês são a minha voz quando eu não posso falar;
Vocês são meus olhos quando eu não posso ver;
Vocês vêem o que tem de melhor em mim;
Me erguem quando eu não posso alcançar;
Vocês me dão fé porque vocês acreditam em mim.
Sou tudo o que sou
Porque vocês me deram todo o seu amor, carinho e educação;
Vocês me dão asas e me deixam voar;
Seguram a minha mão e assim eu posso tocar o céu;
Quando perco minha fé, vocês a trazem de volta
E dizem que nenhuma estrela é inalcançável;
Quando vocês estão do meu lado eu me sinto maior!
Vocês são a minha inspiração....*

*A Deus Pai, sempre presente comigo, e agradeço pelas mãos estendidas
nos momentos difíceis, dando-me força e sabedoria para diferenciar
o que é bom do que é ruim, obrigado por me dar coragem
para estender as mãos em vez de cruzar os braços.*

*Aos meus irmãos Pedro Augusto Feliciano e Geísa Marielle Feliciano, à minha afilhada abençoada
Lavínia e à toda minha família, dos mais distantes e ausentes aos mais
próximos agradeço pelo incentivo e entusiasmo
a cada fase dessa etapa.*

Meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora Prof^ª Dr^a Julia Maria Costa Cruz, e co-orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, que acreditaram em meu potencial e que não mediram esforços em dedicar a mim suas lições de saber, suas experiências e competências profissionais. Agradeço pela amizade, paciência e boa vontade em ter compartilhado comigo seus conhecimentos partes essenciais para a minha formação e realização deste trabalho. Manifesto meu reconhecimento e estima.

Ao meu noivo Leonardo Oliveira Machado, pessoa muito especial, que a cada dia enriquece minha vida mais e mais, agradeço pelo incentivo e sorrisos nos momentos de desânimo. Agradeço imensamente pela compreensão nos muitos momentos de ausência.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Nanobiotecnologia pela agradável convivência e pelos momentos de descontração durante o período de trabalho. Em especial agradeço aos colegas e amigos Vanessa da Silva Ribeiro, Henrique Tomaz Gonzaga, Patricia Tiemi Fujimura e Fabiana de Almeida Araújo que não mediram esforços em me ajudar na etapa final de desenvolvimento do meu trabalho;

Às funcionárias Maria do Rosário F. Gonçalves Pires, Elaine Silva Marques Faria, Scheila Pedrosa Franco Barbosa agradeço pela amizade e auxílio em todos os momentos;

Aos colegas e amigos Bellisa Freitas Barbosa, Loyane Bertagnolli Coutinho, Rosiane Nascimento Alves e Ester Cristina Borges, pessoas muito especiais a quem tenho muita estima e admiração, agradeço pela companhia nos momentos de dificuldade compartilhados e nos momentos de distração depois de um dia duro de trabalho. Vocês são presentes de Deus;

Ao colega e amigo de pós-graduação Marcelo Arantes que não mediu esforços em auxiliar em meus experimentos, agradeço pela amizade e pelas sugestões que enriqueceram meu trabalho;

Aos colegas de pós-graduação engraçados e aos sérios, aos que algumas vezes me jogaram no chão e aqueles que sempre me levantaram, a todos que de alguma forma fizeram parte de minha vida, agradeço pela amizade e pelos momentos enriquecedores vividos no dia a dia;

Aos mestres do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, que compartilharam comigo seus conhecimentos e sua própria existência, e que, além disso, me deram apoio nas horas mais difíceis de minha jornada, o meu sincero agradecimento;

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Campus Uberlândia, onde trabalho, agradeço pelo apoio e pela liberação nos dias em que precisei trabalhar em minha tese;

Há muito mais a quem agradecer... Enfim agradeço a todos aqueles que, embora não nomeados, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, o meu reconhecimento e carinhoso muito obrigada !!!

LISTA DE ABREVIações

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
%	Por cento/porcentagem
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	<i>Area under curve</i> ; área sob a curva
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de busca de alinhamento local básico)
BSA	Soroalbumina bovina
CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
<i>Cut-off</i>	limiar de reatividade, ponto absoluto/ótimo de corte
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ED	Eficiência do diagnóstico
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
EGTA	Etilenoglicol-bis-β-aminoetil éster
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático ligado a enzima)
ER2738	<i>Escherichia coli</i> cepa ER2738
Es	Especificidade
F1	Bacteriófago da linhagem F1
Fd	Bacteriófago da linhagem M13
<i>g</i>	Gravidade

Grupo 1	Pacientes com estrogiloidíase
Grupo 2	Pacientes infectados por outras parasitoses
Grupo 3	Indivíduos aparentemente saudáveis
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imudodeficiência Humana
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon γ
IPTG	Isopropil- β -d-tiogalactopiranosídeo
IR	Índice de reatividade
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodaltons
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potassio
L2	Larvas rabditóides
L3	Larvas filarióides
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LR	<i>Likelihood ratio</i> ; razão de verossimilhança
M	Molar
M13	Bacteriófago da linhagem M13
MAPS	<i>Multiple Antigenic Peptides</i>
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfonico monohidratado

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mL	Mililitros
mM	milimolar
N	normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NaI	Iodeto de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaN ₃	Azida de sódio
NBT/BCIP	Nitroazul de tetrazólio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
NIE	Antígeno recombinante de 31 kDa de <i>S. stercoralis</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
pIII	Proteína três do capsídeo do fago
pVI	Proteína seis do capsídeo do fago
pVII	Proteína sete do capsídeo do fago
pVIII	Proteína oito do capsídeo do fago
pIX	Proteína nove do capsídeo do fago
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline – Tween</i> (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20)
PBS-TM	<i>Phosphate buffered saline – Tween – Milk</i> (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D.-C7C	Biblioteca comercial de <i>Phage display</i> de 7 aminoácidos de conformação rígida
pmol	Picomol
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> (Curvas de características de operação do Receptor)
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Se	Sensibilidade
TA	Temperatura ambiente
TBS	Tampão salina Tris
TBS –T	Tampão salina Tris adicionada de Tween 20
TBS –TM	Tampão salina Tris adicionada de Tween 20 e leite desnatado)
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic</i> (Curvas de características de operação do receptor de dois gráficos)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Hidroximetil
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
Tween-20	Polioxietilensorbitano-monolaurato
Ufc	Unidade formadora de colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. – INTRODUÇÃO	14
1.1 – Aspectos biológicos de <i>Strongyloides stercoralis</i>	15
1.2 – Epidemiologia da estrongiloidíase humana	17
1.3 – Aspectos clínicos da estrongiloidíase humana	18
1.4 – Resposta imune do hospedeiro	19
1.5 – Diagnóstico da estrongiloidíase humana	21
1.6 – Tecnologia de exposição de biomoléculas em fagos (<i>Phage display</i>) e seleção (<i>Biopanning</i>) de peptídeos recombinantes	25
2 – OBJETIVOS	28
2.1 – Objetivos gerais	28
2.2 – Objetivos específicos	28
3 – MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 – Aspectos éticos	29
3.2 – Local de realização	29
3.3 – Normas de biossegurança	29
3.4 – Amostras de soro humano	30
3.5 – Preparação do extrato alcalino total de <i>S. venezuelensis</i>	31
3.6 – Purificação da Imunoglobulina G por microesferas magnéticas	31
3.7 – <i>Dot blot</i> para confirmação da purificação das Imunoglobulinas G	32
3.8 – Seleção dos Peptídeos por <i>Phage display</i>	32
3.8.1 – <i>Biopanning</i>	32
3.8.2 – Titulações	35
3.9 – Extração de DNA dos clones de Fagos	35
3.10 – Sequenciamento de DNA dos peptídeos expressos na superfície dos Fagos	36
3.11 – Análise de Bioinformática	36
3.12 – Amplificação dos clones de fagos que apresentam similaridade com proteínas de <i>S. stercoralis</i>	37
3.13 – Pré-validação por <i>Phage</i> -ELISA dos clones selecionados	37

3.14 – Amplificação dos clones de fagos considerados mais relevantes no ensaio de pré-validação	38
3.15 – <i>Phage</i> -ELISA para estudo da imunorreatividade e validação dos clones de fagos selecionados	39
3.16 – <i>Phage</i> -ELISA de competição	40
3.17 – Síntese química dos peptídeos expressos na superfície dos fagos selecionados que apresentaram melhores parâmetros	40
3.18 – ELISA para verificação da imunogenicidade dos peptídeos sintéticos	40
3.19 – Análise estatística dos resultados obtidos no <i>Phage</i> -ELISA e no ELISA de peptídeo	41
4 – RESULTADOS	43
4.1 – Produção do extrato salino total de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	43
4.2 – Purificação de Imunoglobulina G por microesferas magnéticas e <i>Dot blot</i> para confirmação da purificação	43
4.3 – <i>Biopanning</i> e Titulações	44
4.4 – Extração de DNA	47
4.5 – Sequenciamento de DNA dos clones de Fagos e Análise de Bioinformática	48
4.6 – Pré-validação por <i>Phage</i> -ELISA	51
4.7 – <i>Phage</i> -ELISA para estudo da imunorreatividade e validação dos clones de fagos selecionados	52
4.8 – <i>Phage</i> -ELISA de competição	57
4.9 – Síntese química dos peptídeos expressos na superfície de fagos selecionados	58
4.10 – ELISA para verificação da imunorreatividade dos peptídeos sintéticos	58
5 – DISCUSSÃO	65
6 – CONCLUSÕES	72
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

Estrongiloidiase humana é uma importante parasitose intestinal em todo mundo, 50% das pessoas infectadas são assintomáticas, entretanto pode haver hiperinfecção e disseminação em pacientes imunocomprometidos, levando à morte. A detecção precoce da doença previne o desenvolvimento das síndromes de hiperinfecção e disseminação, assim, o uso de uma ferramenta diagnóstica eficiente é de grande importância para identificar e controlar esta parasitose. Devido à falta de eficiência nos testes parasitológicos e sorológicos disponíveis atualmente para detectar estrongiloidiase humana é necessário aprimorar os testes imunodiagnósticos utilizando antígenos recombinantes e sintéticos, uma vez que há limitações para obter e utilizar antígenos homólogos, produzidos a partir do parasito. O objetivo deste trabalho foi selecionar por *Phage display* peptídeos miméticos a *Strongyloides stercoralis* ligantes a imunoglobulinas G de pacientes com estrongiloidiase. Uma biblioteca PhDTM-C7C foi utilizada no processo de seleção e o DNA dos clones selecionados foi extraído, sequenciado e analisado por ferramentas de bioinformática. Os testes ELISA foram feitos utilizando cinco clones de fagos distintos, os quais tiveram similaridades significantes com proteínas de *S. stercoralis*, e dois peptídeos sintéticos correspondentes às sequências expressas por dois clones selecionados. A especificidade de ligação de cada clone de fago ao *pool* de soros de pacientes com estrongiloidiase foi analisada por ELISA de competição. Sensibilidade, especificidade, eficiência diagnóstica, áreas sob a curva e razão de verossimilhança foram calculados para cada antígeno. Todos os clones de fagos analisados apresentaram alto potencial diagnóstico alcançando área sob a curva maiores que 0,8, se destacando o clone C9 com razoável sensibilidade (87,5%), especificidade (80%) e eficiência de diagnóstica (82,5%). Os peptídeos sintéticos C10 e D3 apresentaram desempenho diagnóstico superior, com áreas sob a curva maiores que 0,9 e excelente sensibilidade (95%, 95%), especificidade (86,3%, 92,5%) e eficiência de diagnóstica (89,2%, 93,3%) respectivamente. Concluiu-se que os peptídeos selecionados por *Phage display* podem mimetizar epitopos de *S. stercoralis* e representam alternativa promissora aos antígenos atualmente disponíveis para utilização no diagnóstico da estrongiloidiase humana.

Palavras chave: Estrongiloidiase, imunodiagnóstico, peptídeos, *Phage display*, mimotopos.

ABSTRACT

Selection and application of recombinant and synthetic peptides obtained by phage display in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis

Human strongyloidiasis is an important intestinal parasitic infection worldwide, 50% of infected individuals are asymptomatic, however it can cause hyper infection and dissemination in immunocompromised hosts leading to death. Early detection of the disease prevents the development of hyper infection and dissemination syndromes, so the use of an efficient diagnostic tool has great importance to identify and control this parasitic disease. Due to the lack of efficiency in parasitological and serological tests currently available to detect human strongyloidiasis it is necessary to improve immunodiagnostic tests using recombinant and synthetic antigens once there are limitations to obtain and use homologous antigens produced from the parasite. The aim of this study was to select using phage display technology *Strongyloides stercoralis* mimetic peptides ligands to immunoglobulin G from patients with strongyloidiasis. The PhDTM-C7C library was used in the selection process and the DNA of the selected clones was extracted, sequenced and analyzed using bioinformatics tools. ELISA tests were done by using five distinct phage clones, which presented significant similarity with proteins from *S. stercoralis*, and the two synthetic peptides corresponding to the sequences displayed on two phage clones. Binding specificity of each phage clone to the pool of sera from patients with strongyloidiasis was analyzed by competitive ELISA. Sensitivity, specificity, diagnostic efficiency, area under curve and likelihood ratio were calculated for each antigen. All phage clones presented high diagnostic potential achieving area under curves higher than 0.8, the C9 clone presented reasonable sensitivity (87.5%), specificity (80%) and diagnostic efficiency (82.5%). Synthetic peptides C10 and D3 showed superior diagnostic performance, with areas under the curve greater than 0.9 and excellent sensitivity (95%, 95%), specificity (86.3%, 92.5%) and diagnostic efficiency (89.2%, 93.3%) respectively. It was concluded that the selected peptides by Phage display can mimic *S. stercoralis* epitopes and represent promising alternative to the currently available antigens for human strongyloidiasis diagnosis.

Keywords: strongyloidiasis, immunodiagnosis, peptides, phage display, mimotopes.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 2 bilhões de pessoas estão infectadas com algum parasito intestinal, constituindo um problema de saúde pública. No Brasil estima-se que 50 milhões de pessoas, ou seja, 30% da população estão acometidas com alguma verminose (MONTEIRO et al., 1986; OMS, 2004).

Estrongiloidíase é uma parasitose intestinal causada por nematódeos do gênero *Strongyloides* que acometem mamíferos, principalmente o homem, mas pode ser encontrada em outras espécies, tais como: aves, répteis e anfíbios (VINEY; LOK, 2007). O nematódeo do gênero *Strongyloides*, pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditia, família Strongylidae. O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas foram descritas como infectantes para o homem, são elas: *Strongyloides stercoralis*, (Bavay, 1876) Stiles & Hassall (1902) considerada a de maior importância clínica, e *Strongyloides fuelleborni* (Grassi, 1879), causadora da estrongiloidíase humana na África e nas Filipinas (GROVE, 1996).

O parasito *S. stercoralis* foi identificado pela primeira vez em 1876, pelo médico francês Louis Normand na cidade de Toulon; França, ao examinar fezes diarréicas de soldados franceses que trabalhavam na Cochinchina (atual Vietnã). Esta doença foi conhecida durante anos como diarreia da Cochinchina. A elucidação do ciclo evolutivo completo ocorreu apenas 50 anos após a descoberta do parasito. As formas parasitárias foram primeiramente descritas por Bavay em 1876, como *Anguillula* (latim *Anguillula* = pequena enguia ou peixe longo e *stercus* = esterco) para as encontradas na luz intestinal e como *Anguillula intestinalis* para as obtidas em necropsia (GROVE, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Outras espécies, tais como *Strongyloides venezuelensis* e *Strongyloides ratti* são utilizadas como modelos experimentais em roedores para estudo da infecção humana, bem como para a biologia do seu agente causador (TAKAMURE, 1995; GROVE, 1996; CHIUSOMINICUCCI et al., 2010). Durante a infecção em roedores por *S. venezuelensis*, ocorre a migração das larvas através do pulmão antes de se estabelecerem na mucosa intestinal do hospedeiro sendo similar à migração de *S. stercoralis* em humanos (FERREIRA et al., 2007).

A infecção por *S. stercoralis* normalmente é auto-limitada e de baixa morbidade em indivíduos imunocompetentes. No entanto, torna-se grave nos quadros de imunocomprometimento (FERREIRA et al. 1999; KEISER; NUTMAN, 2004;

VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; MONTES et al. 2009; DAVE et al., 2014). Pacientes imunossuprimidos como, por exemplo, com HIV/AIDS, sob tratamento com corticosteróides, transplantados, com neoplasias, tuberculose, subnutrição e/ou alcoolistas, têm sua resposta imune celular comprometida, e dessa forma estão predispostos ao desenvolvimento de infecções graves causadas pelo *S. stercoralis* (OLIVEIRA et al., 2002; FERREIRA, 2005; SILVA et al., 2005; MARCOS et al., 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; COSTA-CRUZ, 2011; ARNDT, et al., 2013). Outras doenças crônicas como, por exemplo, glomerulonefrite e diabetes mellitus também influenciam nos aspectos imunológicos, patogênicos e patológicos da estrogiloidíase (MENDONÇA et al., 2006).

A estrogiloidíase humana acomete aproximadamente 50 a 100 milhões de pessoas em todo o mundo, mas acredita-se que o número de pessoas infectadas seja ainda maior, e apesar da alta prevalência ainda é considerada uma parasitose com risco de ser negligenciada. A doença pode evoluir para casos graves resultando em óbito (GROVE, 1996; VINEY; LOK, 2007; MARCOS et al., 2008; MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010; SCHÄR et al., 2013; McCARTY; TURKELTAUB; HOTEZ, 2014).

1.1. Aspectos biológicos de *Strongyloides stercoralis*

As espécies de *Strongyloides* são as menores dentre os nematódeos e apresentam uma peculiaridade interessante: a única forma parasitária adulta presente no intestino delgado é a fêmea partenogenética, que se reproduz dentro do hospedeiro sem a presença do macho, liberando seus ovos no duodeno (GROVE, 1996).

Essas espécies têm ciclos evolutivos complexos, e possuem seis formas evolutivas, adultos parasitários e de vida livre, morfologicamente distintos. A maioria destes helmintos apresenta a habilidade de se manter alternando gerações homogônicas ou diretas em ciclos parasitários; e heterogônicas ou indiretas, em repetidas proles de vida livre (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; COSTA-CRUZ, 2011). As diferentes espécies do gênero têm ciclos de vida semelhantes (ANDERSON, 2000; FERREIRA et al., 2007; VINEY, LOK, 2007).

As fêmeas partenogenéticas triplóides ($3n$) se instalam na mucosa intestinal e liberam de 30 a 40 ovos por dia, produzindo simultaneamente, três tipos de ovos que originam as larvas rabditóides, estas são encontradas nas fezes ou em fluidos intestinais. As larvas rabditóides (L2) podem ser triplóides ($3n$), diplóides ($2n$) ou haplóides ($1n$), e são liberadas no interior do hospedeiro. Estas fases evolutivas podem se desenvolver em dois ciclos distintos. O primeiro é o direto ou partenogenético, no qual as larvas rabditóides ($3n$) chegam ao meio

externo com as fezes, e transformam-se diretamente em larvas filarióides (L3) infectantes. O segundo ciclo é o indireto ou de vida livre, no qual as larvas rabditóides (2n) e (1n) transformam-se, respectivamente, em fêmeas e machos de vida livre, que por reprodução sexuada, originam larvas filarióides infectantes (L3) (GROVE, 1996).

Os hospedeiros humanos tornam-se infectados por *S. stercoralis* quando as larvas filarióides L3 penetram ativamente na pele íntegra ou ocasionalmente pelas mucosas, principalmente da boca e esôfago quando são deglutidas através de alimentos contaminados. Essas larvas secretam proteases que auxiliam tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos. Após a penetração, as L3 caem na circulação sangüínea, passam pelo ventrículo direito, chegam aos capilares pulmonares onde se diferenciam em L4 e atravessam a membrana alveolar, migrando pela árvore brônquica até a faringe. As L4, então, podem ser expectoradas pelo reflexo da tosse que provocam, ou serem deglutidas, passando pelo esôfago, estômago e finalmente, atingindo o intestino e se instalando na mucosa do duodeno e jejuno, chegando à maturidade como fêmeas partenogénéticas parasitas que iniciam a oviposição. Os ovos de *S. stercoralis* são eliminados já larvados na mucosa intestinal do hospedeiro humano e eclodem antes da eliminação das fezes. Este fato torna difícil a visualização deles nas fezes de humanos infectados, a menos que o indivíduo esteja com diarreia grave. O período pré-patente (da penetração de L3 à oviposição da fêmea) para *S. stercoralis* em humanos é de aproximadamente 8-25 dias (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2011).

A contaminação do solo pelo parasita resulta do hábito de defecação no chão. Para que as larvas rabditóides sobrevivam no solo, desenvolvam-se até adultos machos e fêmeas de vida livre e se multipliquem, são necessárias algumas condições ambientais. O solo deve ser arenoso, poroso, rico em matéria orgânica, úmido e sem de luz direta. A temperatura ótima deve variar entre 25 a 30°C. A evolução torna-se lenta entre 11 e 19°C, e abaixo de 8°C as larvas rabditóides tornam-se inviáveis (REY, 2001). A hetero ou primoinfecção, que ocorre através da pele, é o modo usual de transmissão, mas há outros tipos de infecção, como autoinfecção que é característica peculiar deste parasito (TAKAMURE, 1995; VINEY; LOK, 2007). A autoinfecção pode ocorrer tanto na forma externa (L2 na região perianal transformam-se em L3 e penetram nessa região) quanto interna (L2, ainda na mucosa intestinal, transformam-se em L3 que penetram na região do íleo e cólon). A autoinfecção é responsável pela longa permanência do parasito no hospedeiro e o principal fator no desenvolvimento das formas graves da strongiloidíase (CARVALHO; PORTO, 2004). O processo de autoinfecção pode sofrer exacerbação com aumento do número de larvas e

fêmeas paternogenéticas, chamado de hiperinfecção, neste caso as formas podem se disseminar por todo organismo e persistir por muitas décadas (VINEY; LOK, 2007; COSTA-CRUZ, 2011).

1.2. Epidemiologia da estrogiloidíase humana

Entre as infecções causadas por geo-helminhos, com transmissão via solo, a estrogiloidíase está entre os seis primeiros lugares, referindo-se apenas as infecções ativas. Contudo o número de pessoas potencialmente expostas ou com quadro de infecção sub-clínico é muito maior (BETHONY et al., 2006; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2007).

Estima-se que entre 50 e 100 milhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas com *S. stercoralis* (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; VINEY; LOK, 2007; MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010). Três regiões mundiais foram definidas de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (< 1%), endêmica (1-5 %) e hiperendêmica (> 5 %) (STUERCHLER apud PIRES; DREYER, 1993).

A estrogiloidíase humana tem distribuição mundial heterogênea, as áreas endêmicas estão situadas, principalmente, entre os trópicos, onde o clima tropical favorece o desenvolvimento do parasito, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; SANDOVAL et al., 2004; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007, MARCOS et al., 2008; ANDRADE et al., 2010). Dentre esses países destacam-se a Colômbia, Peru, Brasil, Chile, República Central Africana, Zaire e Costa Rica (DE BONA; BASSO, 2008). América Latina e África apresentam índices preocupantes desta parasitose, a prevalência chega a 50% (NEUMANN; RITTER; MOUNSEY, 2012).

Nas regiões desenvolvidas do mundo, como Sudeste da América do Norte e Europa, as infecções são freqüentes em trabalhadores do campo e também têm origem não autóctone em razão dos imigrantes e visitantes de áreas endêmicas (CELEDON et al., 1994; SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008).

No Brasil a prevalência da estrogiloidíase varia de 3,9% a 7,9% entre as cinco regiões do país, sem variação entre zona rural (4,8%) e área urbana (5,0%), representando grande importância de saúde pública. Esta prevalência está relacionada à precárias condições sócio econômicas associadas ao processo desordenado de urbanização, as quais favorecem a transmissão de parasitos intestinais devido à péssimas condições higiênico-sanitárias de

muitas regiões periféricas. As maiores taxas de prevalência foram encontradas nos estados do Amapá, Goiás, Rondônia e Minas Gerais. As taxas de infecção variam de acordo com a região analisada, o grupo populacional e os métodos de diagnóstico parasitológico empregados pelos pesquisadores, o que dificulta a comparação dos dados (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; DE BONA; BASSO, 2008; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

Em Minas Gerais, na cidade de Uberlândia, utilizando métodos parasitológicos, foi reportado 13% de positividade em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), 3,31% em crianças hospitalizadas (PAULA et al., 2000), 33,3% em alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002), 12% em pacientes HIV positivos (SILVA et al., 2005); 3,8% em pacientes diabéticos (MENDONÇA et al., 2006), 9,1% em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO et al., 2008a); 4,4 % em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009) e 5% em idosos (NAVES; COSTA-CRUZ, 2013).

1.3. Aspectos clínicos da *estrongiloidíase* humana

A maior parte dos indivíduos com *estrongiloidíase* possui a forma assintomática ou apresenta manifestações clínicas brandas (ROSSI et al., 1993; SEGARRA-NEWNHAM, 2007). A patologia e a sintomatologia da *estrongiloidíase* não estão somente relacionadas à carga parasitária, mas também à fatores do hospedeiro. Entre estes fatores estão a diminuição da resistência orgânica e o estado de nutrição do paciente, podendo evoluir com largo espectro de manifestações clínicas. A doença pode evoluir desde as formas assintomáticas ou oligossintomáticas em indivíduos com baixa carga parasitária, até formas graves e fatais em pacientes imunocomprometidos, devido a desnutrição crônica, diabetes mellitus, lupus, insuficiência renal crônica, alcoolismo e corticoterapia prolongada (KEISER; NUTMAN, 2004; GREINER; BETTENCOURT; SEMOLIC, 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; HOCHBERG et al., 2011).

Clinicamente, a forma aguda da *estrongiloidíase* é pouco detectada em áreas endêmicas e as manifestações clínicas são decorrentes da penetração e migração da larva pela pele, o que pode ocasionar lesões eritemato-papulosa pruriginosa conhecida como larva *currens*, e de sua passagem pelos pulmões. O paciente pode apresentar um quadro de broncoespasmo, tosse e desconforto respiratório, decorrentes da pnemonite eosinofílica, conduzindo à síndrome de Loeffler, que é caracterizada pelos infiltrados pulmonares na radiografia do tórax, acompanhados de eosinofilia periférica. A instalação das fêmeas na

mucosa intestinal do paciente pode ocasionar dor abdominal inespecífica ou epigastralgia de natureza semelhante a quadro ulceroso péptico (KEISER; NUTMAN, 2004; GRYSCHK; SICILIANO, 2010). A forma crônica da *estrongiloidíase* pode ser leve, moderada ou grave; quando leve, geralmente é assintomática. Nas formas moderada e grave há predomínio de manifestações digestivas como dor abdominal, diarreia e vômitos, sendo estas manifestações mais intensas na forma disseminada, podendo levar à desidratação, síndrome da má absorção, isquemia mesentérica, distúrbios hidroeletrólíticos, hipoalbuminemia e, em alguns casos, a íleo paralítico. O envolvimento pulmonar acarreta em tosse e hemoptise relacionadas à migração larval (COSTA-CRUZ, 2011).

A forma disseminada é decorrente de um quadro de hiperinfecção, caracterizada por uma grande migração das larvas oriundas de autoinfecção. Este estágio caracteriza a forma grave da *estrongiloidíase*, em que o parasito pode ser encontrado em vários órgãos como: sistema nervoso central, linfonodos mesentéricos, coração, pâncreas, rins, ovários e musculatura esquelética (FERREIRA et al., 1999; VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; VELOSO; PORTO; MORAES, 2008; FEELY et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011). Durante a disseminação as larvas filarióides penetram pela parede do intestino grosso, com isso podem carrear bactérias responsáveis por quadros infecciosos sistêmicos, que podem inclusive ocorrer durante a hiperinfecção. A forma disseminada da *estrongiloidíase* é frequentemente fatal, devido a sua rápida evolução e diagnóstico tardio (KEISER; NUTMAN, 2004; SHORMAN; AL-TAWFIQ, 2009; GRYSCHK; SICILIANO, 2010).

1.4. Resposta imune do hospedeiro

A imunidade desenvolvida pelo hospedeiro mediante infecção por nematódeo pode ocorrer por meio de mecanismos de destruição do verme adulto ou das larvas durante a autoinfecção. Na resposta imune estão envolvidas células T antígeno específicas que liberam citocinas e induzem a produção de anticorpos e mudanças inflamatórias (ONAH; NAWA, 2000; PORTO et al., 2002; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

Estudos envolvendo a resposta imune contra helmintos têm sido realizados em modelos experimentais e, nestes casos há evidências de que tanto a resposta imune celular como a humoral estão envolvidas contra estes parasitos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006; FINNEY et al., 2007). Na maioria dos casos as respostas imunes dos hospedeiros contra os parasitos são similares, sendo respostas T-dependentes com perfil Th2, com a produção de interleucinas (IL) IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, envolvidas na sinalização das células

(OVINGTON; BEHM, 1997; TURNER et al., 2003; MONTES et al., 2009; COSTA-CRUZ, 2011). As interleucinas produzidas induzem rápida resposta humoral mediada por IgE, e resposta celular mediada por eosinófilos, basófilos, mastócitos, associados com a destruição das larvas e eliminação dos vermes (GENTA, 1996; WEINSTOCK; SUMMERS; ELLIOT, 2005; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

Embora a resposta Th2 esteja associada com a proteção do hospedeiro na maioria dos modelos experimentais de infecção por helmintos em murinos, o exato mecanismo responsável por este fenômeno ainda não foi completamente esclarecido (LAWRENCE et al., 1995; NEGRÃO-CORRÊA, 2001).

Os antígenos do parasito são apresentados para os linfócitos T CD4+, via MHC II (complexo de histocompatibilidade principal classe II), que assim podem desempenhar sua função na resposta imune adaptativa. As células T CD4+ podem ser divididas em duas populações distintas de células T “helper” tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), baseado no perfil de citocinas secretadas. O perfil Th1 produz interferon-gama (IFN- γ) que é responsável pela resposta imune celular, enquanto as células Th2, associadas às respostas imunes contra alérgenos e helmintos, secretam citocinas e cooperam com os linfócitos B na produção de anticorpos específicos. Como as células Th1 e Th2 secretam citocinas com funções antagônicas, existe uma modulação da atividade celular (ONAH; NAWA, 2000; PORTO et al., 2002; HIRATA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

No mecanismo T-independente há a produção, pelos macrófagos, de citocinas e mediadores da inflamação antígeno-inespecíficos. Estas moléculas são o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e a IL-1 que atuam nas células caliciformes do intestino estimulando a proliferação das mesmas, e conseqüente aumento na produção de muco. O muco é secretado na luz intestinal e reveste as fêmeas parasitas, o que previne o estabelecimento na mucosa ou leva à expulsão das mesmas. Assim, proteínas do muco gastrointestinal, as mucinas, são constituintes da primeira linha de defesa do hospedeiro contra os helmintos. As mucinas são glicoproteínas poliméricas ricas em resíduos de aminoácidos que se ligam à sítios para oligossacarídeos presentes no tegumento dos parasitos (MARUYAMA et al., 2000, 2002; ONAH; NAWA, 2000).

A hipersensibilidade mediada pela imunoglobulina E (IgE) antígeno-específica é a mais rápida resposta imune efetora contra os parasitos e inicia-se quando os mastócitos já sensibilizados liberam os mediadores pré formados estocados em grânulos intracitoplasmáticos que incluem a histamina, heparina, proteases e fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos (GALIOTO et al., 2006). Níveis elevados de IgE foram

demonstrados em pacientes imunocompetentes com estrogiloidíase (RODRIGUES et al., 2004), mas, na doença disseminada e nos casos de imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade (PORTO et al., 2001; MARCOS et al., 2008). O ciclo do parasito sugere também que ele pode estimular a resposta local e sistêmica mediada por anticorpos IgA. Pacientes humanos sintomáticos graves apresentam redução significativa da concentração de IgA e IgM específicas, entretanto, não há alteração nos níveis de IgG (COSTA-CRUZ, 2011).

A IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo a 70-75% do total de anticorpos séricos. A classe engloba 4 subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 distintas nas sequências de aminoácidos no domínio das cadeias constantes (OCHS; WEDGWOOD, 1987; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003). Entre as subclasses de IgG, IgG1 e IgG4 participam na elaboração da resposta imune contra *S. stercoralis* (ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). Acredita-se que IgG4 esteja envolvida no bloqueio da resposta protetora promovida pela IgE, ou seja, modula as respostas alérgicas IgE-mediadas pela ligação em sítios dos mastócitos (ATKINS et al., 1997; ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). O aumento dos níveis de IgG4, que se segue às infecções primárias, pode reduzir a expulsão dos parasitos, pelo fator mencionado anteriormente, o que permite o estabelecimento das fêmeas parasitas. A estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas de hipersensibilidade (IgE-mediadas) para a persistente autoinfecção e, que consequentemente, reduz os efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997). Nos casos de doença disseminada e de imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS et al., 2008).

1.5. Diagnóstico da estrogiloidíase humana

O diagnóstico da estrogiloidíase humana ainda é um desafio (DREYER et al., 1996). O diagnóstico clínico da estrogiloidíase humana é incerto uma vez que a maioria dos casos são assintomáticos, ou quando estão presentes, os sintomas pulmonares e intestinais são comuns à outras parasitoses. Com isso, é necessária a utilização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWALA; GHOSHAL, 2009). O diagnóstico baseia-se na identificação de formas parasitárias de *S. stercoralis*. Os parasitos podem ser encontrados com menor frequência em fluídos de aspirado duodenal e ocasionalmente em outros tecidos ou fluidos do hospedeiro como lavado brônquico, escarro, urina, esfregaço de sangue periférico e líquido; ou amostras de tecido

sólido, como em biópsia de pele e endoscopia do sistema digestório (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; SUDRÉ et al., 2006; VAN DOORN et al., 2007; PASQUALOTTO et al., 2009; KAKATI et al., 2011). Esses métodos são empregados em pacientes que apresentam a forma grave de estrogiloidíase. Classicamente, o diagnóstico definitivo é confirmado pelo encontro de larvas nas fezes, no entanto, em virtude da liberação de larvas ser pequena e irregular, as mesmas podem não ser detectadas nos métodos parasitológicos convencionais comprometendo a sua sensibilidade (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001; HIRA et al., 2004; HIRATA et al., 2007; REQUENA-MENDÉZ et al., 2013).

No intuito de aumentar a sensibilidade do exame coprológico, foram desenvolvidas técnicas de cultivo dos estágios larvais. Elas baseiam-se no desenvolvimento do ciclo indireto de *Strongyloides*, que permite a concentração do número de larvas (LIU; WELLER, 1993). Entre as técnicas de cultura estão a de cultura em papel filtro (HARADA; MORI, 1955) e de placa de ágar (KOGA et al., 1991; STEINMANN et al., 2007).

Por meio de métodos de concentração de larvas em fezes, estádios larvais podem ser encontrados em amostras fecais pelo exame microscópico. Há apenas um relato de recuperação do estágio adulto em amostras de fezes (HONG et al., 2009). Os métodos de concentração de larvas de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) e o de Rugai, Mattos e Brisola (1954), os quais se baseiam no hidrotropismo das larvas são utilizados com sucesso e apresentam vantagens como aumento da sensibilidade e simplicidade, e rapidez de execução (REY, 2001). Para que o diagnóstico parasitológico atinja 100% de sensibilidade é imprescindível que sete amostras de fezes sejam colhidas e analisadas (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001). Pela inconveniência e dificuldade para o paciente coletar as amostras necessárias muitos médicos apresentam resistência em solicitar o exame parasitológico de fezes. Na maioria das vezes, o exame é realizado em poucas amostras e mesmo o paciente estando infectado, larvas podem não ser detectadas, e ser erroneamente diagnosticado como falso negativo (SATO et al., 1995a).

Testes imunológicos têm sido úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soroepidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos. As principais técnicas utilizadas são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI) direcionados para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos, com variações nas preparações antigênicas; *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando como antígeno diferentes extratos

de larvas filarióides, homólogas ou heterólogas, ou detecção de coproantígeno nas fezes e *Immunoblotting*, considerado altamente sensível e específico no reconhecimento de frações protéicas imunodominantes de *Strongyloides* por anticorpos no soro de pacientes infectados (COSTA-CRUZ et al., 1997; SUDRÉ et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN et al., 2007; RIGO et al., 2008; MOTA-FERREIRA et al., 2009; BON et al., 2010; FELICIANO et al., 2010). Estes métodos imunológicos também são vantajosos no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico (BIGGS et al., 2009).

O teste ELISA é considerado superior aos outros testes sorológicos no que diz respeito à praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes. Além disso, a sensibilidade do teste na detecção da estrongiloidíase humana varia entre 85% a 95% e a especificidade pode chegar a 90% (SCHAFFEL et al., 2001; KOOSHA; FESHARAKI; ROKNI, 2004; VAN DOORN et al., 2007, MOTA-FERREIRA et al., 2009).

Muitos pesquisadores vêm utilizando, no imunodiagnóstico da estrongiloidíase, antígenos produzidos a partir de outras espécies de *Strongyloides*, principalmente, *S. ratti* e *S. venezuelensis*. Estes antígenos heterólogos são de fácil obtenção, constituem uma fonte segura de antígenos e não representam risco para seus manipuladores por infectarem apenas roedores (SATO et al., 1995b; COSTA-CRUZ et al., 1997; RODRIGUES et al., 2007; MACHADO et al., 2008b, FELICIANO et al., 2010; GONZAGA et al., 2011, GONÇALVES et al., 2012). Por pertencerem ao mesmo gênero o desenvolvimento e transmissão destes parasitos são similares, o que permite seu uso em modelos experimentais roedores para estudo da doença.

A composição antigênica de *S. ratti* e *S. venezuelensis* foi comparada com a de *S. stercoralis* e estudos mostraram que a sensibilidade e a especificidade não têm diferença estatística significativa, compartilham epítomos em quantidade suficiente para utilização diagnóstica. O que confere segurança e preferência ao uso destas espécies como fontes de antígenos no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2003, 2008b). Estudos utilizando antígenos heterólogos a *S. stercoralis* tem auxiliado, além da padronização de novas técnicas de imunodiagnóstico, também nas pesquisas referentes à biologia molecular, terapêutica e aspectos da interação parasito-hospedeiro: ecologia, patologia e imunologia (NORTHERN et al., 1989; ABE et al., 1998; FERNANDES et al., 2008; GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009, CHIUSO-MINICUCCI et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011; MACHADO et al., 2011).

Normalmente, as preparações antigênicas são resultantes de extração de antígenos solúveis totais em solução salina e têm sido utilizadas em técnicas sorológicas padronizadas. Entretanto, essas preparações não possuem adequada especificidade, pois pode ocorrer

reatividade cruzada com outros parasitos, atribuída à complexidade antigênica dos helmintos. Uma das principais limitações encontradas no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos que permitam seu posterior fracionamento e análise (SIDDIQUI; BERK, 2001; RODRIGUES et al., 2007). Dessa forma, a caracterização e identificação de antígenos *Strongyloides*-específicos se fazem necessárias para o incremento da especificidade dos testes, especialmente, nos mais utilizados como ELISA e *Immunoblotting* (NORTHERN; GROVE, 1987; LINDO et al., 1994).

A técnica de biologia molecular desenvolvida até hoje para diagnóstico da estrongiloidíase é a *polymerase chain reaction* - PCR (Reação em cadeia da polimerase). Essa técnica tem sido desenvolvida para uma ampla variedade de funções, e no diagnóstico da estrongiloidíase tem sido aplicada para detecção do DNA das formas parasitárias em fezes pela técnica de PCR em tempo real. Essa técnica vem demonstrando uma alta sensibilidade quando comparada aos métodos parasitológicos clássicos utilizando amostras de pacientes com baixa carga parasitária (VERWEIJ et al., 2009; ARNDT et al., 2013), no entanto é uma tecnologia com um custo elevado devido ao preço dos equipamentos, o que impede que muitos laboratórios estejam equipados com esta tecnologia (ESPY et al., 2006).

Novas e promissoras técnicas tais como métodos sorológicos baseados na utilização de antígenos recombinantes e técnicas de biologia molecular são alvos de estudo em muitos centros de referência. Antígenos recombinantes produzidos a partir de DNA complementar de bibliotecas formadas a partir de larvas filarióides de *S. stercoralis* tem sido obtidos, mostrando reatividade semelhante ou superior aos antígenos somáticos das larvas. Alguns peptídeos recombinantes ricos em prolina, tem mostrado alta especificidade, sendo reconhecidos por anticorpos IgG4 e IgE, sem reação cruzada com outros helmintos (RAMACHANDRAN et al., 1998).

O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o uso de antígeno recombinante de larva filarióide em reação imunoenzimática (RAVI et al., 2002) e padronização de reações PCR para detecção de material genético de *Strongyloides* (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2011) ou de murino (MARRA et al., 2010). Ensaio para detecção de coproantígeno utilizando anticorpos policlonais contra coproantígeno de amostras fecais humanas, adultos de *S. stercoralis* (EL-BADRY, 2009) ou L3 de *S. venezuelensis* (GONÇALVES et al., 2010) foram padronizados. Autores revelaram sorodiagnóstico da estrongiloidíase humana com

excelente sensibilidade e especificidade utilizando um antígeno recombinante de 31kDa denominado NIE, em um sistema de imunoprecipitação da luciferase. No entanto a produção deste antígeno recombinante requer laboratórios mais equipados, e com isso sua produção envolve custos elevados (RAMANATHAN et al., 2008; KROLEWIECKI et al., 2010).

Atualmente, pesquisas têm buscado diferenças na expressão gênica entre estágios larvares, o que permitiria um melhor entendimento da biologia de *Strongyloides* (SUDRÉ et al., 2007). As espécies do gênero *Strongyloides* ainda não estão bem caracterizadas a nível molecular e novas técnicas moleculares podem definir epítomos que por sua vez podem ser utilizados para detecção de anticorpos presentes em indivíduos acometidos por estrogiloidíase (MARCILLA et al., 2010). Diante da importância e da necessidade de um diagnóstico preciso e sensível, é de grande importância a utilização de técnicas que minimizem os problemas relacionados à especificidade e sensibilidade dos diagnósticos existentes.

1.6. Tecnologia de exposição de biomoléculas em fagos (*Phage display*) e seleção (*Biopanning*) de peptídeos recombinantes

Phage display é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam à outras moléculas com diversas finalidades, como mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de fagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressa fica exposta na superfície do fago fusionado à uma proteína endógena. Bibliotecas de peptídeos geradas por *Phage display* são extensivamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores e enzimas (RADER; BARBAS, 1997; HAARD; HENDERIKX; HOOGENBOOM, 1998; BARBAS et al., 2001; IRVING; PAN; SCOTT, 2001; WILSON; WALKER, 2002; LIU et al., 2004; HUTCHINSON et al., 2004; ANDRE et al., 2005; LANG et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010; MANHANI et al., 2011; VAN NIEUWENHOVE et al., 2012). É uma tecnologia vantajosa uma vez que possibilita a produção de proteínas solúveis, apresenta baixo custo, fácil manuseio e rapidez além de apresentar conexão direta entre o fenótipo e o genótipo encapsulado, o que possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados (ADDA et al., 2002).

A tecnologia *Phage display* foi descrita inicialmente por Smith (1985) e tem provado ser uma técnica eficiente na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões

de diferentes peptídeos ou proteínas (BENHAR, 2001). A metodologia de bibliotecas mais amplamente utilizada é baseada no uso de fago filamentosso M13, um bacteriófago que infecta a bactéria *Escherichia coli* (BENHAR, 2001; SERGEEVA et al., 2006).

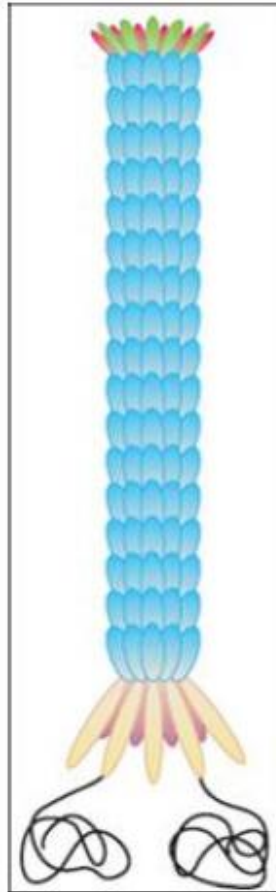


Figura 1. Estrutura de fago filamentosso. Visualiza-se um peptídeo (filamento preto) fusionado na proteína PIII (amarelo), as outras proteínas constitutivas do fago são: pVI (rosa), pVII (vermelho), pIX (verde) e pVIII (azul). Adaptado de Smothers; Henikoff; Carter (2002)

Os fagos filamentosos (linhagens M13, f1, fd, entre outros) pertencem à família *Inoviridae* de bacteriófagos e possuem como material genético DNA de fita simples. A partícula viral, é composta pelo genoma viral e por cinco proteínas estruturais, no capsídio do fago: as proteínas p III, p VI, p VIII, p VII e p IX. A pIII está relacionada com a infectividade do fago, a infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao pilus F de uma *E. coli* do gênero masculino. Uma das vantagens é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e

secreta partículas de fago sem sofrer lise (BRÍGIDO; MARANHÃO 2002; HEMMINGA et al., 2010).

Na biblioteca de fagos filamentosos, um grande número de proteínas relevantes pode ser selecionada e separada. Para isso, dois passos são essenciais: o *biopanning* (seleção por afinidade) e o chamado *screening* (triagem) (BARBAS et al., 2001; KRETZSCHMAR; VON RUDEM, 2002). No processo de *panning*, a biblioteca de fagos produzida é incubada com o alvo de escolha, para que ocorra a interação com este. Em seguida, uma série de lavagens é procedida para remover os fagos não aderidos, ou seja, aqueles que não codificaram a sequência alvo desejada, sem que haja interferência na interação fago-alvo. Logo após, os fagos selecionados (ligantes) podem ser obtidos, com o uso de condições que desfavoreçam a ligação destes com a molécula alvo. A aplicação de gradientes de pH, reações proteolíticas e eluições competitivas podem ser realizadas sem que haja, no entanto, um comprometimento da infectividade do fago (BENHAR, 2001; BRIGIDO; MARANHÃO, 2002, KRETZSCHMAR; VON RUDEM, 2002). Os fagos recuperados são então amplificados por infecções sequenciais em bactérias, sendo realizadas novas etapas de *biopanning* (de três a cinco, em média). No final é gerado um misto policlonal, porém enriquecido com ligantes antígeno-específicos. (BARBAS et al., 2001; KRETZSCHMAR; VON RUDEM, 2002).

A vantagem dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas, além da facilidade em mapear grande número de clones simultaneamente (AZZAY; HIGHSMITH, 2002). Esta metodologia tem se mostrado útil não apenas para o mapeamento de interações proteína-proteína, mas também na identificação de moléculas alvo importantes para o desenvolvimento de vacinas, drogas, e ferramentas diagnósticas contra parasitos como *Plasmodium* sp., causador de malária; *Brugia malayi*, causadora de filariose linfática e *Taenia solium* relacionada à neurocisticercose humana (GNANASEKAR et al., 2008; LANZILLOTTI; COETZER, 2008; RIBEIRO et al., 2010; MANHANI et al., 2011).

Uma vez selecionados, estes peptídeos de interesse podem ser sintetizados em escalas variadas, e em seguida podem ser utilizados em ensaios fisiológicos, químicos, ou imunológicos; e podem ainda ser empregados na obtenção de biossensores e utilizados como alvo para seleção e produção de anticorpos recombinantes auxiliando dessa forma no imunodiagnóstico de diferentes doenças infecciosas (MACHADO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

- ✓ Selecionar por *Phage display* peptídeos miméticos ligantes às imunoglobulinas G de pacientes com *estrongiloidíase*, a serem utilizados como ferramenta diagnóstica para *estrongiloidíase* humana.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Utilizar a tecnologia de *Phage display* na seleção de peptídeos com afinidade aos anticorpos IgG de pacientes acometidos pela *estrongiloidíase*;
- ✓ Caracterizar os peptídeos expressos nos fagos selecionados, por sequenciamento e bioinformática, determinando os antígenos potenciais no diagnóstico da *estrongiloidíase* humana;
- ✓ Avaliar o potencial diagnóstico dos clones de fagos selecionados por meio do método imunoenzimático ELISA frente a anticorpos IgG presentes no soro de um painel diferente de pacientes com *estrongiloidíase*;
- ✓ Proceder à síntese química dos peptídeos expressos na superfície dos clones que apresentaram melhor potencial diagnóstico;
- ✓ Avaliar a imunorreatividade dos peptídeos sintéticos frente aos anticorpos (IgG) de pacientes com *estrongiloidíase*, pelo teste ELISA .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos (CEP/UFU) (nº 553/2009) da Universidade Federal de Uberlândia.

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

As amostras de soro utilizadas neste estudo estavam armazenadas no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da Universidade Federal de Uberlândia, sob aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU), sob o protocolo de N° 041/2008. Consistem de amostras de soro de pacientes com diagnóstico confirmado para estrogiloidíase humana e outras parasitoses, que foram obtidas por meio da alíquota que seria desprezada, após os exames de rotina, pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais (HC-UFU).

3.2. Local de realização

Todos os procedimentos experimentais, exceto a síntese química de peptídeos, foram realizados nos Laboratórios de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica e no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, da Universidade Federal de Uberlândia.

3.3. Normas de biossegurança

Os procedimentos de colheita e manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram cumpridos de acordo com as normas de biossegurança descrita por Chaves-Borges e Mineo (1997).

3.4. Amostras de soro humano

Foram utilizadas 120 amostras de soro submetidas a testes ELISA para validação dos clones de fagos selecionados e dos peptídeos sintéticos produzidos, em relação à sua reatividade com os anticorpos IgG anti-*Stercoralis*. Estas amostras foram distribuídas em 3 grupos:

- **Grupo 1:** 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis*;
- **Grupo 2:** 40 amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, sendo: *Ascaris lumbricoides* (7), *Enterobius vermicularis* (5), *Schistosoma mansoni* (3), *Hymenolepis nana* (7), *Taenia* sp. (5), *Giardia lamblia* (3), *Trichuris trichiura* (n=2) e Ancilostomídeos (8);
- **Grupo 3:** 40 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, baseado em sua história clínica e sem evidências de contato prévio com *S. stercoralis*, e que apresentaram diagnóstico parasitológico de fezes negativo para qualquer parasito.

Para a purificação de imunoglobulinas IgG utilizadas no processo de *Biopanning* foi utilizado um novo painel de amostras de soro, diferente das amostras utilizadas nos testes de validação. Este novo painel foi constituído por 18 amostras, destinadas a preparação dos *pools* de soros: 6 amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis* (Grupo 1); 6 de pacientes infectados por outros parasitos (Grupo 2) e 6 de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3).

Todas as amostras de soro foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológico de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e o método de Lutz (1919); e submetidos a diagnóstico sorológico para detecção de IgG específica utilizando antígeno homólogo.

3.5. Preparação do extrato salino total de *S. venezuelensis*

O extrato total salino foi produzido a partir de alíquotas de 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis* conforme metodologia descrita por Rodrigues et al. (2007), com algumas modificações. As larvas foram descongeladas e ressuspensas em 1mL de solução tampão fosfato (PBS 0,15M - NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, pH 7,4). Foi adicionado 2mM de EGTA, 2 mM de EDTA e 0,3 mg dos inibidores de proteases CompleteTM (Boehringer Mannheim, Alemanha). Em seguida, para extração antigênica as larvas foram trituradas no homogeneizador de tecidos (Omnith International, EUA) por 5 ciclos de 5 minutos em banho de gelo e posteriormente foram submetidas a 8 ciclos de 20 segundos de tratamento por ultra-som a 40 kHz (Thorton, Inspec Eletrônica, São Paulo). O preparado foi incubado sob agitação lenta por 18 horas à 4°C e centrifugado a 12400 x *g* por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e seu conteúdo protéico foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e estocado a - 20 °C até o momento do uso. O extrato foi utilizado no ensaio ELISA de competição, para verificar se os peptídeos expressos na superfície dos bacteriófagos selecionados mimetizavam proteínas de *Strongyloides* sp.

3.6. Purificação da imunoglobulina G por microesferas magnéticas

Para purificação da Imunoglobulina G, foram utilizados *poosl* de soro (6 amostras de soro) de cada um dos 3 grupos de pacientes (com strongiloidíase, outras parasitoses e aparentemente saudáveis). A purificação ocorreu por intermédio de esferas magnéticas (beads magnéticos) conjugadas com proteína G (*Dynalbead Protein G*).

Foram colocados em um microtubo 100µl de microesferas magnéticas de proteína G correspondente a 2×10^9 partículas, que foram lavadas três vezes com tampão MES (0,1 M, pH 5,0) para ativar as microesferas; em seguida, 100µl do *pool* de soros foi acrescentado, e incubado sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente (TA). As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então lavadas novamente três vezes com tampão MES a fim de retirar os anticorpos não ligantes.

Para realizar a ligação covalente entre a proteína G presente na microesfera e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpo foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão trietanolamina (0,2M pH=8,2) e ressuspendido em 1mL de tampão de ligação covalente (20mM de dimetil pimelinidato x 2HCl em tampão trietanolamina – 0,2 M, pH 8,2) por 30 minutos sob agitação leve a TA. A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do

sistema *beads*-anticorpos com 1mL de tampão Tris (50mM pH=7,5) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de tween e incubadas com a solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0,05% de tween) *overnight* a 4°C, e ressuspensas em 200ul de TBS. A quantidade de anticorpos obtida foi estimada pelo método de detecção e quantificação de proteínas descrito por Jonhstone e Thorpe (1987), onde a Concentração da amostra = Absorbância à 280 nm X Fator de diluição/ 1,36.

3.7. *Dot blot* para confirmação da purificação das Imunoglobulinas G

Uma membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 2µl de cada um dos três *pools* de IgG purificada. A membrana foi incubada a TA, até secagem do material, lavada três vezes por 5 minutos cada com solução tamponada de Tris (TBS, Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM) acrescido de 0,1% de Tween 20 (TBS-T 0,1%). Após as lavagens, a membrana foi bloqueada por 1 hora à TA com 1 ml de tampão de bloqueio TBS-TM 5% (TBS-T 0,1% acrescido de 5% de leite em pó desnatado) e lavada mais três vezes como anteriormente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina (*Sigma Chemical*) na diluição 1:2000, preparada em tampão de bloqueio e incubada por mais 1h a TA. A reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP (Nitrozol de tetrazólio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato - *Sigma*). O teste possuiu um controle positivo (*pool* de soro de pacientes com *estrongiloidíase*) e um negativo (BSA 5%).

3.8. Seleção dos Peptídeos por *Phage display*

3.8.1. *Biopanning*

Foram utilizadas 10µL (1×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da New England BioLabs® Inc.), diluída em 190µl de TBS-T 0,1% para a seleção de ligantes de IgG de pacientes com *estrongiloidíase*. A biblioteca é composta de sete aminoácidos randômicos expressos na região da pIII do bacteriófago, os quais são flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto. Inicialmente foi realizado uma seleção negativa utilizando como alvo IgGs purificadas de pacientes com outras parasitoses e pacientes saudáveis, com o intuito de eliminar os fagos que expressavam

peptídeos inespecíficos, e em seguida foi realizada a seleção positiva, contra IgGs de pacientes com esrongiloidíase, ou seja, contra IgG anti-*Strongyloides*.

A seleção foi realizada com 20µl das microesferas de proteína G acopladas às IgGs purificadas dos diferentes grupos, tanto nas seleções negativas quanto nas positivas. Para a seleção negativa a biblioteca de *Phage display* foi incubada, por 30 minutos a TA, com as microesferas acopladas com IgGs do grupo de pacientes com outras parasitoses, em seguida, as microesferas foram precipitadas por centrifugação e o sobrenadante (contendo os fagos não ligantes) foi transferido a outro tubo contendo microesferas acopladas com IgGs de pacientes aparentemente saudáveis. O material foi incubado nas mesmas condições da seleção anterior e o sobrenadante livre de fagos ligantes aos alvos inespecíficos foi recuperado.

Para a seleção positiva, o sobrenadante de fagos desta última seleção foi transferido para um tubo contendo microesferas acopladas com IgGs de pacientes com esrongiloidíase e incubado por 30 minutos a TA. As microesferas contendo o sistema *beads*-anticorpo, acopladas com IgGs de pacientes com esrongiloidíase mais o fago foram lavadas 10 vezes com TBS-T 0,1%, a fim de descartar os fagos não ligantes. Os fagos selecionados, que mostraram afinidade às IgGs de pacientes com esrongiloidíase foram eluídos com 500µl de glicina pH 2,0 e neutralizados com 75µL de Tris pH 9. O eluato foi transferido para um microtubo e mantido sob refrigeração até ser utilizado na próxima etapa (titulação e amplificação dos fagos).

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi realizada pela inoculação no meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (densidade óptica-DO 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500µl do eluato do fago selecionado pelas microesferas acopladas a IgGs de pacientes com esrongiloidíase e incubado a 37°C por 4-5 horas, sob forte agitação.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12-16 horas a 4°C para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1 mL de TBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200µl de

TBS a 0,02% de NaN_3 , obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C. Este eluato amplificado resultante do primeiro ciclo de seleção foi submetido a um segundo ciclo, e assim subsequentemente por um total de 3 ciclos de seleção. No terceiro aumentou-se a estringência do tampão de lavagem de 0,1% para 0,5%, utilizando-se então 0,5% de Tween 20 em todas as lavagens. Em todos os três ciclos de seleção foi realizada a seleção negativa, utilizando IgGs do grupo de pacientes aparentemente saudáveis e IgGs de pacientes acometidos por outros parasitos, sendo os fagos ligantes específicos, recuperados na seleção positiva após a incubação com IgGs de pacientes com *estrongiloidíase*. Desta forma, os fagos selecionados, considerados específicos para as moléculas comuns entre pacientes sadios ou não, e não específicos para a doença em questão foram desprezados, e apenas os específicos para *estrongiloidíase* foram recuperados após eluição na seleção positiva. O procedimento está esquematizado na figura 2.

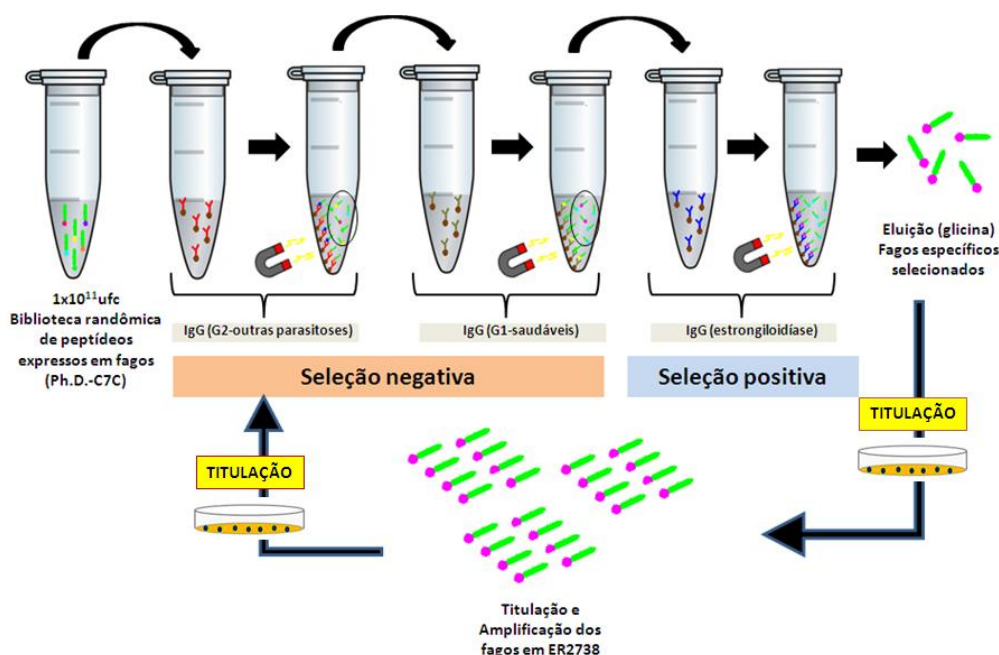


Figura 2. Ciclo de *Biopanning* para seleção de fagos por afinidade a anticorpos IgG-anti *Strongyloides*. A biblioteca de fagos M13 foi incubada com 20µL IgG's acopladas aos *beads* dos pacientes do Grupo 2 (outras parasitoses) por 30 minutos; em seguida o sobrenadante com os fagos livres foram recuperados e incubados por 30 minutos com as IgG's de indivíduos do Grupo 3 (saudáveis). Posteriormente o sobrenadante com os fagos livres não ligados às IgG's inespecíficas foi recuperado e incubado com o alvo específico, ou seja, IgG's de pacientes do Grupo 1 (com *estrongiloidíase*). O sobrenadante foi descartado e o sistema *beads*-anticorpo mais fagos foi lavado com TBS-T 0,1% para eliminação dos fagos não ligados e os fagos selecionados foram eluídos com glicina, titulados, e amplificados pela infecção de bactérias *E. coli* (2738), precipitados e submetidos a novo ciclo de seleção com intuito de aumentar a afinidade de ligação ao alvo específico.

3.8.2. Titulações

O procedimento de titulação foi utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante a entrada e saída de cada ciclo do *Biopanning*. A solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob log10 em meio LB. Para eluatos não amplificados de cada ciclo foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} e no caso das soluções com eluatos amplificados a faixa de diluição utilizada foi entre 10^{-8} até 10^{-11} . Para cada diluição, acrescentou-se 200µL da cultura de ER2738 na fase *early log* (DO 600nm ~ 0,3) e a solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a TA. As células bacterianas, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top (210mg de Agarose, 600mg de LB, 30mg $MgCl_2$) a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período, as colônias azuis que se formaram nas placas foram contadas e quantificadas. A coloração azul das colônias confirmaram a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β -galactosidase pelo fago.

3.9. Extração de DNA dos clones de Fagos

As colônias azuis oriundas das placas tituladas do ultimo ciclo do *biopanning*, foram coletadas de forma randômica e transferidas para poços de placas de cultura (tipo *deepwell*), contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (DO 600 ~ 0,3), para serem re-amplificadas separadamente e depois submetidas ao processo de extração do DNA dos fagos. A placa foi, então incubada a 37°C, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, a fim de isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos; o sobrenadante foi descartado e 100µL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação por 10 minutos, à TA, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol a 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído

em 20µL de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

3.10. Sequenciamento de DNA dos peptídeos expressos na superfície dos Fagos

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) nas seguintes condições: Desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (50°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A precipitação do DNA sequenciado foi feito com 1µL de Acetato de Amônio e 27,5µL de Etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

3.11. Análise de Bioinformática

Os peptídeos selecionados em um *biopanning* correspondem a um pequeno fragmento de uma proteína maior que tem um papel específico em um processo biológico complexo. A simples seleção de um peptídeo marcador para estrogiloidíase humana não fornece informação a respeito deste processo biológico. Estratégias de bioinformática podem fornecer informações complementares sobre possíveis proteínas relacionadas com os peptídeos selecionados. Análises de bioinformática podem indicar possíveis alvos relacionados aos peptídeos e com estes alvos compreender o processo biológico ao qual os peptídeos pudessem estar relacionados.

Para a identificação dos peptídeos selecionados, primeiramente, as sequências de nucleotídeos codificadoras dos peptídeos foram identificadas, através da análise das

sequências de DNA, utilizando a ferramenta *translate* do programa Expasy disponível em <http://www.expasy.org>. Depois de identificados, os peptídeos foram analisados em relação as homologias entre os mesmos, utilizando o programa CLUSTAL W versão 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Este programa inclui ainda na análise, o pareamento entre os peptídeos selecionados e formulação dos motivos (sequências consenso).

As sequências dos nucleotídeos referentes aos clones sequenciados foram analisadas quanto à sua similaridade com outras sequências de proteínas de *S. stercoralis* já registradas em bancos de dados através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Este programa busca similaridades entre sequências é designado para comparar alinhar as sequências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucléicos e proteínas). Dentro do *Blast* a busca foi realizada no “*Protein blast*” e restrita ao parasito do gênero *S. stercoralis*.

3.12. Amplificação dos clones de fagos que apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis*

Os clones que de acordo com análises de bioinformática apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis*, foram novamente amplificados para serem testados em ensaio de pré-validação por ELISA, a fim de identificar clones mais relevantes, ou seja, que apresentem maior reatividade às IgGs de pacientes acometidos por estrogiloidíase.

De uma placa de backup previamente estocada, 5µL de cada um dos clones foram transferidos para poços de placas de cultura (tipo *deepwell*), contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), em fase *early-log* (DO 600 ~ 0,3) contendo tetraciclina. A placa foi vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 18h, sob vigorosa agitação (250 rpm). As placas foram centrifugadas a 4000 rpm, a 10°C, durante 10 minutos, e o sobrenadante contendo os clones de fagos reamplificados foram recuperados e utilizados no ensaio de pré-validação.

3.13. Pré-validação por *Phage-ELISA* dos clones selecionados

Os nove clones amplificados como citado acima, foram submetidos ao ensaio ELISA com o intuito de realizar um rastreamento prévio quanto a reatividade dos peptídeos expressos nos fagos selecionados com os anticorpos IgGs presentes em *pool* de soro de pacientes dos três grupos de estudo.

Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com 1µg/poço de anticorpo anti-M13 (GE Healthcare) sem marcação, diluído em tampão carbonato (50mM pH 9,6) e incubada por 18h a 4°C. Após a sensibilização, descartou-se o sobrenadante, e a mesma foi bloqueada com tampão de bloqueio PBS-TM 5% (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20, suplementado com 5% de leite em pó desnatado) por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se a placa uma vez com PBS-T e adicionou 100µL do sobrenadante de cada fago/poço obtida no item anterior e de cultura de fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) para controle das reações, e incubou por 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, duas vezes com PBS-T a 0,05%, e os clones foram incubados por 1 hora a 37°C com *pool* de soro de pacientes de cada grupo de estudo (G1, G2 e G3), na proporção de 1:80, diluído em tampão de bloqueio. Lavou-se a placa três vezes com PBS-T e, posteriormente, incubou com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:2000 em tampão de bloqueio PBS-TM, durante 1 hora a 37°C. A placa foi lavada novamente, três vezes com PBS-T a 0,05% e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada, pela revelação da reação utilizando-se o substrato cromogênico OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloroide – Sigma), no volume final de 50 µL de tampão apropriado contendo H₂O₂ e interrompida pela adição de 2µL de H₂SO₄ 2 N. A leitura da absorbância foi feita em leitor de placas (*Ip Reader, Thermoplate*), com filtro de 492 nm.

3.14. Amplificação dos clones de fagos considerados mais relevantes no ensaio de pré-validação

Do ensaio realizado no item anterior, foram selecionados cinco clones de fagos considerados mais reativos, os quais foram novamente amplificados com o intuito de se obter volume de fagos suficientes a serem utilizados nos ensaios ELISA (*Phage-ELISA*). Foram transferidos 20µL de cada um dos clones relevantes, previamente estocados em placa de backup, para erlemeyer contendo 100 mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (DO 600 ~ 0,3) e tetraciclina. Posteriormente, cada cultura foi incubada a 37°C, por 18h, sob vigorosa agitação (250 rpm) e centrifugada a 4000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Ao sobrenadante contendo os clones de fagos re-amplificados foi adicionado PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante, incubado em repouso a 4°C por 18h, e posteriormente centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo os fagos foi

ressuspendido em 100µL de TBS, foram quantificados em espectrofotômetro e estocados a 4°C, até o uso nos testes ELISA.

3.15. *Phage*-ELISA para estudo da imunorreatividade e validação dos clones de fagos selecionados

Os cinco clones foram submetidos ao teste ELISA para confirmar a sua reatividade com anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, presentes em amostras de soro de pacientes com strongiloidíase. Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o *Phage*-ELISA (concentração de antígeno - fagos, condição de bloqueio da placa, diluição ideal de soro e conjugado a serem utilizados).

Placas de microtitulação (Maxisorp, NUNC, USA) foram sensibilizadas com cada clone e fago selvagem a uma concentração de 1×10^{10} ufc/poço diluídos em 50µL de tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 18h à 4°C. Após uma lavagem com PBS-T a 0,05% foi adicionado 200 µL de tampão de bloqueio PBS-TM 3% (PBS-T a 0,05% acrescido com leite em pó desnatado 3%), sendo a placa incubada por mais 1 hora a 37°C, e em seguida lavada 3 vezes. As amostras de soro (G1 – 40 soros de pacientes positivos para strongiloidíase; G2 – 40 soros de pacientes acometidos por outras parasitoses e G3 – 40 soros de pacientes aparentemente saudáveis) foram adicionadas, sendo diluídas em PBS-TM 3% na diluição ideal 1:80, sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada mais 6 vezes para adição do anticorpo conjugado, anti-IgG humana marcado com peroxidase *Fc specific* (Sigma), em PBS-TM 3%, na diluição ideal 1:2000 também previamente determinada, sendo incubada à 37°C por 1 hora. A reação foi revelada utilizando-se OPD, num volume final de 50µL de tampão apropriado (citrato trissódico 0,04 mol/l, ácido cítrico 0,01 mol/l) contendo H₂O₂ 0,33% e interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 2N. A leitura da densidade óptica (DO) de cada amostra foi realizada em leitor de ELISA (*Trp Reader, ThermoPlate*) no comprimento de onda de 492 nm.

Todos os clones foram testados em duplicata e para o controle negativo foi testada a reatividade de cada soro contra o fago selvagem. A densidade óptica final para cada amostra de soro testando os diferentes clones foi ajustada pela razão entre a absorbância de cada clone e a absorbância do fago selvagem. Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice de reatividade ELISA (IR), onde $IR = (DO \text{ final de cada amostra} / cut-off)$, sendo o *cut-off* para cada clone determinado pelas curvas *receiver operating characteristic* (ROC) e *two-*

graph receiver operating characteristic (TG-ROC) (GREINER; SÖHR; GOBEL, 1995). As amostras com $IR > 1$ foram consideradas positivas.

3.16. *Phage*-ELISA de competição

O ensaio ELISA de competição utilizando os 5 clones de fagos foi realizado para verificar a especificidade de ligação dos clones às IgGs de *pool* de soro de pacientes com *strongiloidíase*. Foi realizado nas mesmas condições que o *Phage*-ELISA, descrito no item anterior, exceto pela pré-incubação (37°C por 2h) do *pool* de soros com diferentes concentrações de antígeno total de *S. venezuelensis* (1; 5; 12,5 e 25 µg/ml).

A leitura da absorbância foi feita em leitor de placas (*Tp Reader*, *ThermoPlate*) no comprimento de onda de 492 nm, e os resultados expressos em densidade ótica.

3.17. Síntese química dos peptídeos expressos na superfície dos fagos selecionados que apresentaram melhores parâmetros diagnósticos

Uma vez confirmada pelo teste ELISA o potencial diagnóstico dos clones de fagos selecionados, procedeu-se à etapa de síntese dos peptídeos, a partir dos 3 clones que apresentaram melhor eficiência diagnóstica, ou seja, os mimotopos C9, C10 e D3. A síntese química foi realizada pela empresa Peptide 2.0 (www.peptide2.com), que produziu os três peptídeos sintéticos na forma liofilizada (5 mg), que foi mantido a -20°C até sua utilização nos testes de validação. A massa molecular e a pureza dos peptídeos C9, C10 e D3 foram respectivamente 2231,48 e 90,31%; 2377,67 e 92,97%; 2141,48 e 95,01%. Cada peptídeo sintético foi constituído por dois mimotopos com a inserção de uma sequência espaçadora (GGGS) entre os peptídeos conformacionais de sete aminoácidos, sendo na extremidade N-terminal acoplado ao BSA e a outra região carboxi-terminal foi realizada amidação.

3.18. ELISA para verificação da imunogenicidade dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos C10 e D3 foram submetidos ao ensaio ELISA para verificar a reatividade dos mesmos com os anticorpos IgG anti-*Strongyloides* presentes no soro de pacientes com *strongiloidíase*. O peptídeo sintético C9 foi descartado desta análise pois apresentou problemas na solubilização, inviabilizando seu uso.

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o ELISA (concentração de antígeno - peptídeo sintético, condição de bloqueio da placa, diluição ideal de soro e conjugado a serem utilizados).

Uma placa de microtitulação (Maxisorp, NUNC, USA) foi sensibilizada com 50µL/poço do peptídeo sintético C10 ou D3 na concentração de 1µg/mL, diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 e incubada por 18h a 4°C. Após a sensibilização, descartou-se o sobrenadante, e a mesma foi lavada uma vez com PBS puro. As amostras de soro (G1 – 40 soros de pacientes positivos para *estrongiloidíase*; G2 – 40 soros de pacientes acometidos por outras parasitoses e G3 – 40 soros de pacientes aparentemente saudáveis) foram adicionadas, sendo diluídas em PBS-T 0,05%-BSA 5% na diluição ideal 1:160, 50uL/poço, sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada seis vezes para adição do anticorpo conjugado, anti-IgG humana marcado com peroxidase Fc *specific* (Sigma), também diluído em PBS-T 0,05%-BSA 5%, na diluição ideal 1:2000, sendo incubada à 37°C por 1 hora.

Lavou-se, novamente, seis vezes com PBS-T 0,05% e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada, pela revelação da reação utilizando-se OPD, num volume final de 50µL/poço de tampão apropriado contendo H₂O₂ e interrompida pela adição de 25µL de H₂ SO₄ 2 N. A leitura da densidade óptica (DO) de cada amostra foi realizada em leitor de ELISA (*Tr Reader, ThermoPlate*) no comprimento de onda de 492 nm.

O ensaio foi realizado em duplicata, os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice de reatividade ELISA (IR), onde $IR = (DO \text{ de cada amostra} / cut-off)$, sendo o *cut-off* para cada antígeno determinado pelas curvas ROC e TG-ROC (GREINER; SÖHR; GOBEL, 1995). As amostras com $IR > 1$ foram consideradas positivas.

3.19. Análise estatística dos resultados obtidos no *Phage*-ELISA e no ELISA de peptídeo

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., EUA). Os testes *phage*-ELISA e ELISA utilizando respectivamente os clones de fagos e os peptídeos sintéticos na detecção de IgG específica em soros dos pacientes com *estrongiloidíase*, tendo como controle grupos de pacientes com outras parasitoses e indivíduos aparentemente normais, de área endêmica foram avaliados. O ponto ótimo (*cut-off*) de cada reação e os parâmetros diagnósticos foram determinados pelas curvas ROC e TG-ROC (GREINER; SÖHR; GOBEL, 1995). A curva ROC avalia em conjunto os valores de sensibilidade e especificidade para obtenção com precisão do *cut-off* da reação, fornece

também índices de eficácia diagnóstica representados por valores da área sobre a curva ou *área under ROC curve* (AUC), onde valores próximos a 1 indicam um teste informativo; valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; McNEIL, 1983).

Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice de reatividade ELISA (IR). Para os ensaios com fagos o IR de cada amostra foi calculado a partir da seguinte fórmula: $IR = [(DO \text{ fago testado} / DO \text{ fago selvagem}) / cut-off]$, onde DO se refere a densidade ótica de cada amostra de soro em cada ensaio. Ao utilizar os peptídeos como antígenos o IR foi calculado pela razão entre DO da amostra e *cut-off*, ou seja $IR = (DO / cut-off)$. As amostras com $IR > 1$ foram consideradas positivas. Teste de Friedman (F) com pós-teste de Dunn foi aplicado para determinar as diferenças entre os grupos para a reatividade dos clones de fagos ou peptídeos.

Os parâmetros de validação diagnóstica avaliados foram área sob a curva (*área under ROC curve* - AUC), sensibilidade (Se), especificidade (Es), eficiência do diagnóstico (ED) e razões de verossimilhança (*likelihood ratio* - LR) positiva (LR+) e negativa (LR-). Esses valores foram obtidos a partir das tabelas de dados das curvas ROC. AUC foi comparada, entre os diferentes fagos ou peptídeos usados no mesmo painel de amostras de soro, utilizando o método de Hanley & McNeil (1983). Valores de probabilidade (P) < 0,05 foram considerados significantes e intervalos de confiança de 95% (IC) foram apresentados para AUC, Se e Es.

A sensibilidade diagnóstica corresponde à medida da capacidade do teste em detectar todos os indivíduos acometidos por determinada doença, apresentando a porcentagem de todos os pacientes positivos. A especificidade se refere à capacidade do teste em ser negativo quando o indivíduo realmente não possui a doença, podendo ser calculado como a porcentagem de resultados negativos em pacientes sem a doença. A eficiência diagnóstica representa a eficiência dos testes, a concordância global dos resultados verdadeiros positivos e negativos em indivíduos com e sem a doença. Razão de verossimilhança ou *likelihood ratio* (LR) indica qual a probabilidade de pacientes com esrongiloidíase ter um teste específico positivo comparado com pacientes não infectados pelo parasito.

A frequência de resultados de reatividade cruzada, para cada parasito no grupo de pacientes acometidos por outras parasitoses, foi descrita. O ensaio de competição foi analisado qualitativamente observando a tendência de diminuição de absorbância com o aumento da concentração do antígeno heterólogo de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

4. RESULTADOS

4.1. Produção do extrato salino total de *S. venezuelensis*

O extrato total salino de *S. venezuelensis* foi produzido a partir de duas alíquotas de 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis*. Foi obtido aproximadamente 2mL de antígeno na concentração protéica de 1600µg/mL. O extrato foi armazenado a -20°C até sua utilização no ELISA de competição.

4.2. Purificação de imunoglobulinas G por microesferas magnéticas e *Dot blot* para confirmação da purificação

A purificação dos anticorpos a partir de *pool* de soros (de pacientes positivos para estrogiloidíase, infectados por outros parasitos e aparentemente saudáveis) pelas microesferas magnéticas se mostrou eficiente. A quantidade de anticorpos purificada está representada na tabela 1. A figura 3 demonstra a membrana de nitrocelulose contendo as amostras de imunoglobulinas G dos 3 *pools* de soros após a confirmação da purificação pela técnica de *Dot blot*.

Tabela 1. Absorbância e quantificação dos anticorpos obtidos após purificação por microesferas magnéticas.

Amostra de soro	Absorbância (280 nm)	Quantificação (mg/mL)
Estrongiloidíase	0,018	1,36
Outros parasitos	0,022	1,78
Indivíduos saudáveis	0,016	1,19

O resultado do ensaio *Dot blot*, confirmou a presença de IgGs nos *pools* de soros, e mostrou que a purificação de IgG foi bem sucedida. O teste de *Dot blot* mostrou-se específico uma vez que não houve qualquer marcação no controle BSA 5% (figura 3).

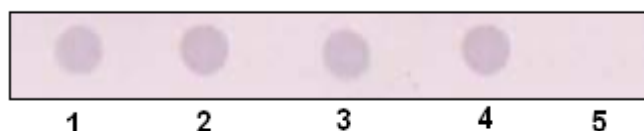


Figura 3 - Membrana de *Dot blot* das amostras de IgG purificadas a partir do *pool* de soros de pacientes positivos para estrogiloidíase (1), acometidos por outros parasitos (2), indivíduos aparentemente saudáveis (3), controle positivo da reação – pool de soro de paciente com estrogiloidíase (4), e controle negativo - BSA 5% (5) após coloração com NBT/BCIP.

4.3. *Biopanning* e Titulações

A seleção de fagos com peptídeos ligantes a IgG de pacientes com estrogiloidíase utilizando a biblioteca de peptídeos expressos na superfície de fagos filamentosos M13 foi concluída com sucesso. Os fagos que se ligaram às IgGs de pacientes saudáveis e com outras parasitoses foram pré selecionados negativamente, de modo que, quando houve a seleção positiva dos peptídeos pelas IgGs de indivíduos com estrogiloidíase, essa foi realizada com alta especificidade.

As titulações foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos, visto que as colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-gal, e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, como consequência do processo de infecção das bactérias pelos bacteriófagos e à incorporação do DNA destes ao genoma bacteriano (figura 4).

Após os três ciclos de seleção, 96 colônias foram coletadas a partir das placas de titulação do último ciclo, para serem submetidas às análises de caracterização.

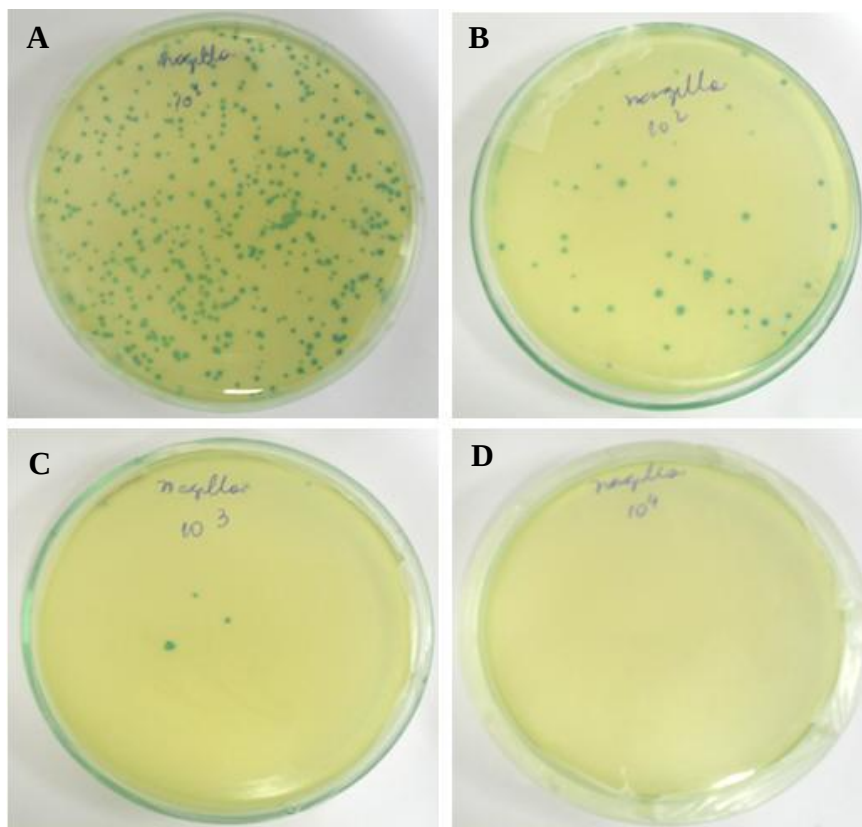


Figura 4 - Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com os fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase. A, B, C e D representam as titulações 10^{-1} à 10^{-4} .

Os títulos de entrada (fagos amplificados) e saída (fagos não amplificados), que representam o enriquecimento dos clones a favor do alvo durante os três ciclos de seleção estão mostrados na tabela 2. Os títulos de entrada do 2º e 3º ciclo correspondem aos eluatos amplificados, resultantes das seleções do 1º e 2º ciclo, respectivamente. Os títulos de saída correspondem aos eluatos não amplificados resultantes de cada ciclo. Cada eluato do respectivo ciclo de seleção foi amplificado de forma a obter quantidades suficientes de fagos a serem utilizados no ciclo subsequente.

Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade às IgGs anti-*Strongyloides* ficaram ligados aos mesmos por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade ao alvo foram removidos durante as lavagens. Nas amplificações ocorreu o inverso, indicando a eficiência do processo.

Tabela 2 - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais IgG anti-*Strongyloides*. Título obtido (ufc) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade

Ciclos	Número de Partículas de Fagos		
		Entrada	Saída
1º Ciclo de seleção	Biblioteca Original	1×10^{11}	2×10^4
2º Ciclo de seleção	Pool de fagos obtidos no 1º Ciclo	9×10^{10}	9×10^3
3º Ciclo de seleção	Pool de fagos obtidos no 2º Ciclo	1×10^9	7×10^3

*Os valores de título de saída correspondem ao eluato não amplificado dos ciclos 1, 2 e 3. Ufc: unidade formadora de colônias

4.4. Extração de DNA

Após o crescimento individual de 96 colônias isoladas, foi realizada a extração do DNA de todos os clones de fagos para posterior sequenciamento. Para a análise da qualidade e quantificação do DNA em gel de agarose de 0,8%, foram escolhidos randomicamente amostras de DNA de 11 clones. O gel foi corado com brometo de etídeo (figura 5). Este procedimento demonstrou que a extração do DNA foi eficiente, e com quantidade suficiente para a realização da reação de sequenciamento.

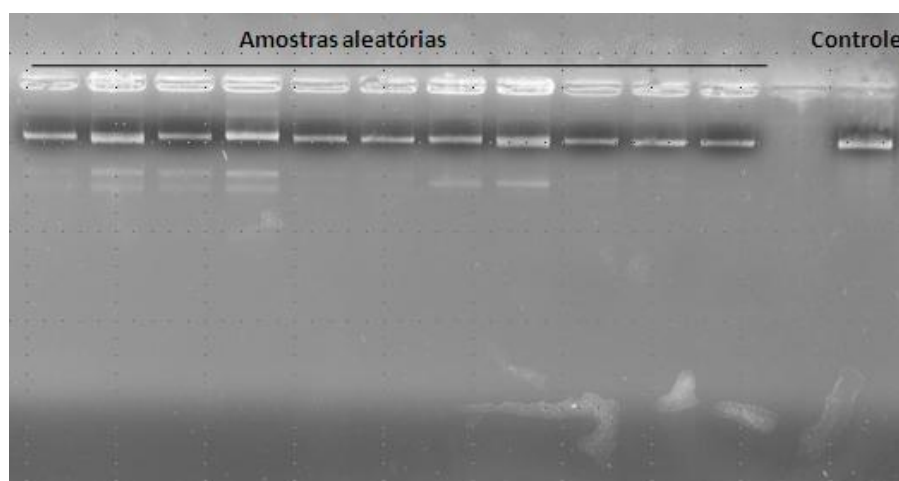


Figura 5. DNA fita simples dos clones de fagos selecionados no *Biopanning*, verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo. Controle: DNA do fago M13 padrão 400 ng.

4.5. Sequenciamento de DNA dos clones de Fagos e análise de bioinformática

Após a confirmação da qualidade do DNA, foi realizado o sequenciamento de 60 clones. Os cromatogramas gerados pelo sequenciador foram analisados pelo programa *Phred basecalling* para análise da qualidade do sequenciamento.

Do total das 60 clones sequenciados, 46 apresentaram sequências inválidas (ou apresentaram erro no sequenciamento ou não apresentavam as sequências inicializadoras ou finalizadoras) e 14 apresentaram sequências válidas, sendo todas diferentes entre si. Destas, três não apresentaram nenhuma similaridade com nenhuma proteína de *Strongyloides* sp. registradas no *GeneBank*; um clone apresentou similaridade apenas com proteínas de *S. venezuelensis*; e um apresentou duas sequências diferentes de aminoácidos pelo seu sequenciamento, sendo também descartado por ser considerado um sequenciamento duvidoso. Desta forma apenas nove clones resultantes (B2, B4, C4, C6, C9, C10, D3, D6 e E6) apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis* registradas no banco de dados do *GeneBank* (tabela 3).

Tabela 3. Similaridade entre as sequências protéicas dos peptídeos selecionados e proteínas de *S. stercoralis* registradas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST, com os números de acesso.

Peptídeo	Potenciais antígenos	Acesso Banco
B2	1) <i>nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone receptors superfamily</i> (489-492)	1) gb AAD37372.1
	2) <i>IgG-immunoreactive zinc finger protein</i> (49-52)	2) gb AAF04101.1 AF188206_1
	3) <i>SMAD-1</i> (69-73)	3) gb AGC25442.1
B4	1) <i>aspartic protease precursor</i> (121-129)	1) gb AAD09345.1
	2) <i>DNAJ-like protein</i> (4-9)	2) gb AAF22128.1 AF126813_1
	3) <i>NADH dehydrogenase subunit 4</i> (342-346)	3) emb CAD90563.1
	4) <i>forkhead transcription factor 1 isoform a</i> (144-148)	4) gb AAQ23177.1
	5) <i>TPA_inf: eukaryotic translation elongation factor 1A</i> (191-195)	gb AAQ23179.1
	6) <i>NADH dehydrogenase subunit 1</i> (238-241)	5) tp DAA05873.1
C4		6) emb CAD90556.1
	1) <i>forkhead transcription factor 1 isoform a</i> (459-462)	1) gb AAQ23177.1
	2) <i>forkhead transcription factor 1 isoform b</i> (284-287)	gb AAQ23179.1
		2) gb AAQ23178.1
C6		gb AAQ23180.1
	1) <i>aspartic protease precursor</i> (209-212)	1) gb AAD09345.1
	2) <i>forkhead transcription factor 1 isoform a</i> (135-136)	2) gb AAQ23177.1
	3) <i>metalloproteinase precursor</i> (29-30)	gb AAQ23179.1
C9		3) gb AAK55800.2
	1) <i>forkhead transcription factor 1 isoform a</i> (180-185)	1) gb AAQ23177.1
C10		gb AAQ23179.1
	1) <i>cytochrome c oxidase subunit I</i> (498-501)	1) emb CAD90560.1
	2) <i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit</i> (1202-1205)	2) gb AFJ11261.1
	3) <i>insulin-like receptor protein tyrosine kinase isoform A</i> (1295-1299)	3) gb AGC25443.1
D3	4) <i>insulin-like receptor protein tyrosine kinase isoform B</i> (1333-1337)	4) gb AGC25444.1
	1) <i>nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone receptors superfamily</i> (84-87)	1) gb AAD37372.1
	2) <i>SMAD-1</i> (172-176)	2) gb AGC25442.1
	3) <i>cytochrome c oxidase subunit I</i> (146-147, 174-180)	3) emb CAD90560.1
	4) <i>cytochrome oxidase subunit 1</i> (56-57, 84-90)	4) dbj BAJ22590.1
D6	5) <i>cytochrome c oxidase subunit I, partial (mitochondrion)</i> (131-132, 159-165)	5) gb AAB71721.1
	1) <i>NADH dehydrogenase subunit 4</i> (333-336)	1) emb CAD90563.1
E6	1) <i>IgG-immunoreactive zinc finger protein</i> (84-87)	1) gb AAF04101.1 AF188206_1
	2) <i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit</i> (1166-1170)	2) gb AFJ11261.1

O programa Clustal W 2.1 foi utilizado para realizar múltiplos alinhamentos com o intuito de identificar regiões conservadas ou motivo comum entre os peptídeos selecionados pela metodologia de *Phage display*. Não foi observada sequências consenso nos alinhamentos entre os peptídeos, entretanto, foi possível observar que alguns possuem semelhanças entre si (tabela 4), pela representação das cores dos aminoácidos. Desta forma, aminoácidos com cores iguais possuem uma característica bioquímica semelhante.

Tabela 4. Alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados pelo *biopanning*, realizado pelo programa Clustal W 2.1. Os dados representam sequências dos clones de fagos ligantes a IgG de pacientes com estrogiloidíase, que apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis*.

Clones selecionados	Peptídeos alinhados
C10	--APSF ^{verde} F ^{verde} H ^{verde} S
D6	--IP ^{verde} S ^{verde} IP ^{verde} V
C9	S ^{verde} RT ^{verde} PS ^{verde} AT--
B4	--F ^{verde} SG ^{verde} SG ^{verde} SR
D3	-SL ^{verde} AS ^{verde} PS ^{verde} L-
B2	SS ^{verde} VPT-LR-
C4	-ST ^{verde} PS-L ^{verde} RA
C6	SS ^{verde} IF ^{verde} TR ^{verde} Y--
E6	-VL ^{verde} K ^{verde} SSL ^{verde} R-

Representação dos aminoácidos: ^{verde} = polares, ^{vermelho} = hidrofóbicos, ^{azul} = ácidos, ^{rosa} = básicos

4.6. Pré-validação por *Phage*-ELISA

A figura 6 demonstra a reatividade dos anticorpos IgG anti-*Strongyloides* presentes em *pool* de soro de pacientes representativos dos três grupos de estudo contra os nove clones selecionados pela técnica de *Phage display* e que apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis*. Todos os clones apresentaram alta reatividade com *pool* de soro de pacientes com estrongiloidíase, mostrando sua capacidade em detectar anticorpos circulantes (IgG anti-*Strongyloides*) em soro de pacientes acometidos pela doença. O fago selvagem apresentou reatividade inferior em comparação aos clones, comprovando a especificidade ao alvo. Cinco clones que obtiveram maior absorbância em *pool* de soros de pacientes com estrongiloidíase e menores absorbâncias com o *pool* de soro de pacientes saudáveis ou com outras parasitoses foram selecionados como os prováveis mimotopos de *S. stercoralis*, e foram submetidos a testes de validação para verificar seu potencial diagnóstico. Os clones escolhidos foram os fagos B2, B4, C9, C10 e D3.

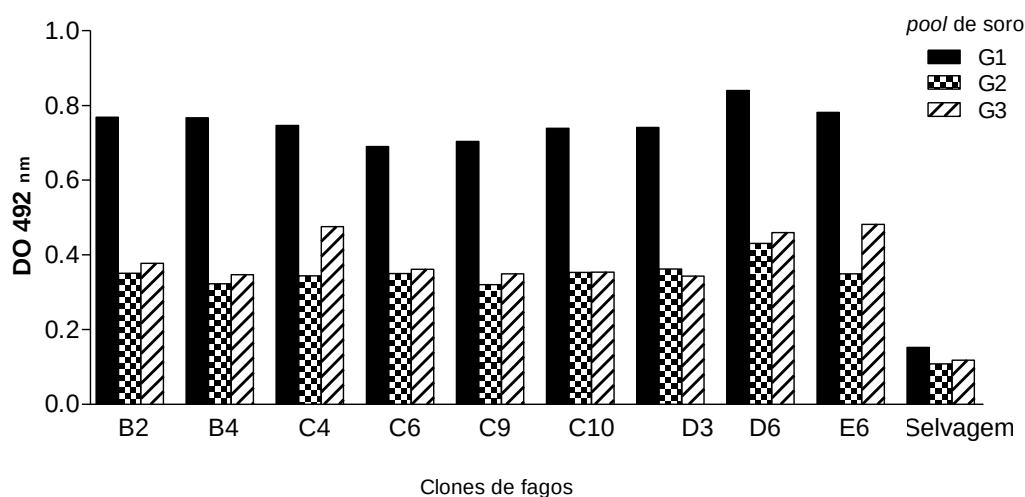


Figura 6. Pré-validação dos clones de fagos reconhecidos por IgG anti-*Strongyloides* em *pool* de soros de pacientes dos grupos G1 – pacientes positivos para estrongiloidíase; G2 – pacientes acometidos por outras parasitoses e G3 –pacientes aparentemente saudáveis.

4.7. *Phage* – ELISA para estudo da imunorreatividade e validação dos clones de fagos selecionados

A figura 7 representa a reatividade dos anticorpos IgG anti-*Strongyloides* circulantes, presentes no soro de pacientes dos três grupos de estudo contra os cinco clones considerados mais relevantes (B2, B4, C9, C10 e D3), os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR), e as amostras que apresentaram valores maiores que 1 foram consideradas positivas.

Os fagos C9 e C10 apresentaram melhor sensibilidade no teste, respectivamente, 87,5% e 85% das amostras de soro do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase) foram positivas para estes clones, enquanto para os fagos B4, D3 e B2 a positividade neste grupo foi 82,5%, 80% e 80%, respectivamente.

No Grupo 2, 22,5% das amostras de soro dos pacientes com outras parasitoses apresentaram reatividade cruzada quando testado o fago B2, menor reatividade cruzada foi observada quando testado o fago C9, somente 12,5% das amostras reagiram. Para os clones B4, C10 e D3 estes valores corresponderam a respectivamente 17,5%, 17,5% e 20% das amostras deste grupo.

No Grupo 3, quando testados a reatividade das IgGs circulantes em amostras de soro de pacientes aparentemente saudáveis, utilizando os fagos B4, B2 e D3 a reatividade cruzada representou 35%, 32,5% e 30%, respectivamente; enquanto os fagos C9 e D3 apresentaram taxas menores, correspondente a 27,5% em ambos.

Curvas ROC, assim como a área sobre a curva (AUC), o *cut-off* da reação, sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico e razão de probabilidade negativa e positiva estão apresentadas na figura 8.

Todos os cinco clones apresentaram área sobre a curva maior que 0,8 variando entre 0,849 (B2) e 0,889 (C10); o que permite afirmar que todos apresentam potencial diagnóstico, possibilitando diferenciar pacientes com estrongiloidíase daqueles não acometidos pela doença; e não houve diferença estatística entre os diferentes clones ($p > 0,05$). Dentre os cinco clones, o fago B2 foi o que apresentou a menor performance, com eficiência de diagnóstico de 75%, sensibilidade de 80%, especificidade de 72,5%. A eficiência de diagnóstico dos fagos B4 e D3 correspondeu a 76,7% em ambos, e o fago C9 apresentou melhor performance na detecção de IgG anti-*Strongyloides* circulante no soro, seguido pelo fago C10. Assim, o fago C9 apresentou eficiência de diagnóstico de 82,5%, sensibilidade de 87,7% e especificidade de

80%, e o fago C10 para estes parâmetros diagnósticos apresentou valores de 80%, 85% e 77,5%, respectivamente.

A reatividade cruzada dos cinco clones de fagos com amostras de soro de pacientes acometidos por outras parasitoses (Grupo 2) pode ser verificada na tabela 5. Todos os fagos reagiram ao menos com uma amostra de soro de paciente infectado com *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*, no entanto nenhum soro de paciente com *Taenia* sp. foi diagnosticado como falso positivo para estrogiloidíase. O fago C9 foi o único que não apresentou reatividade cruzada com soro de pacientes acometidos por ancilostomídeos, e apesar de apresentar reatividade com amostras de soro de pacientes com *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* e *T. trichiura* revelou melhor especificidade neste grupo de pacientes em comparação aos outros clones.

Quando comparado as diferenças na reatividade entre os três grupos de estudo (G1, G2 e G3) quando testados os clones B2, B4, C9, C10 e D3, somente o Grupo 2, composto por amostras de soro de pacientes acometidos por outras parasitoses, mostrou diferença significativa ($p = 0,0016$). Níveis detectados pelo fago B4 foram menores que os detectados pelo fago D3 ($p < 0,05$) neste grupo. Os níveis de detecção de IgG anti-*Strongyloides* utilizando todos os fagos foram maiores no grupo de pacientes com estrogiloidíase em comparação aos Grupos 2 e 3 ($p < 0,0001$), os quais não mostraram nenhuma diferença significativa entre eles.

De acordo com os resultados os três clones com melhor performance diagnóstica, sendo eles os fagos C9, C10 e D3, foram escolhidos para serem submetidos à síntese química.

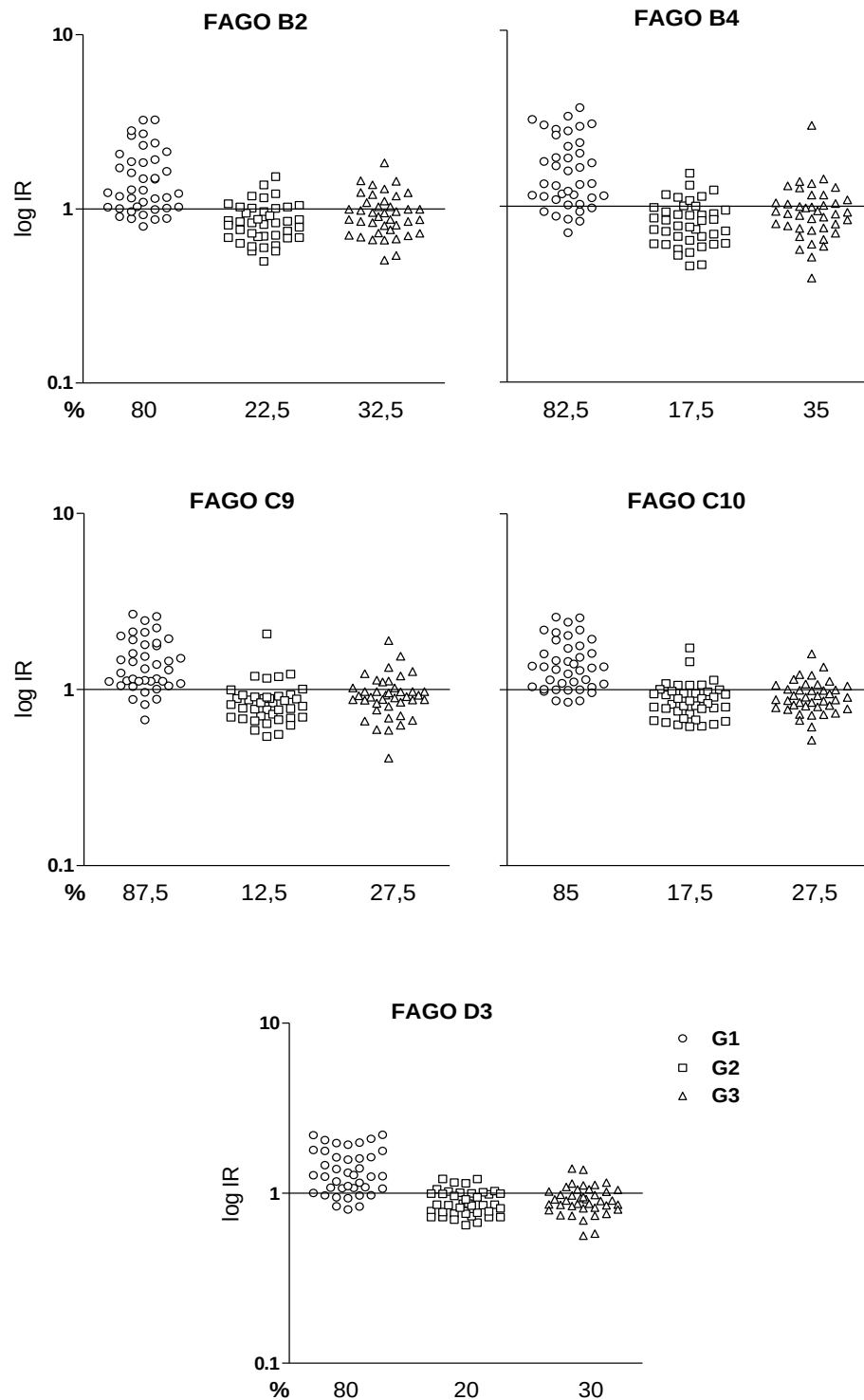


Figura 7. Detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* por *phage*-ELISA em amostras de soro na diluição 1:80 dos indivíduos dos grupos G1 – pacientes positivos para estrongiloidíase (n=40); G2 – pacientes acometidos por outras parasitoses (n=40) e G3 – pacientes aparentemente saudáveis (n=40), mediante utilização dos antígenos: fagos expressando os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 em sua superfície. Os valores estão expressos em índice de reatividade (IR) e a linha horizontal indica o ponto de corte da reação com IR = 1. Os resultados com IR > 1 foram considerados positivos. % = positividade.

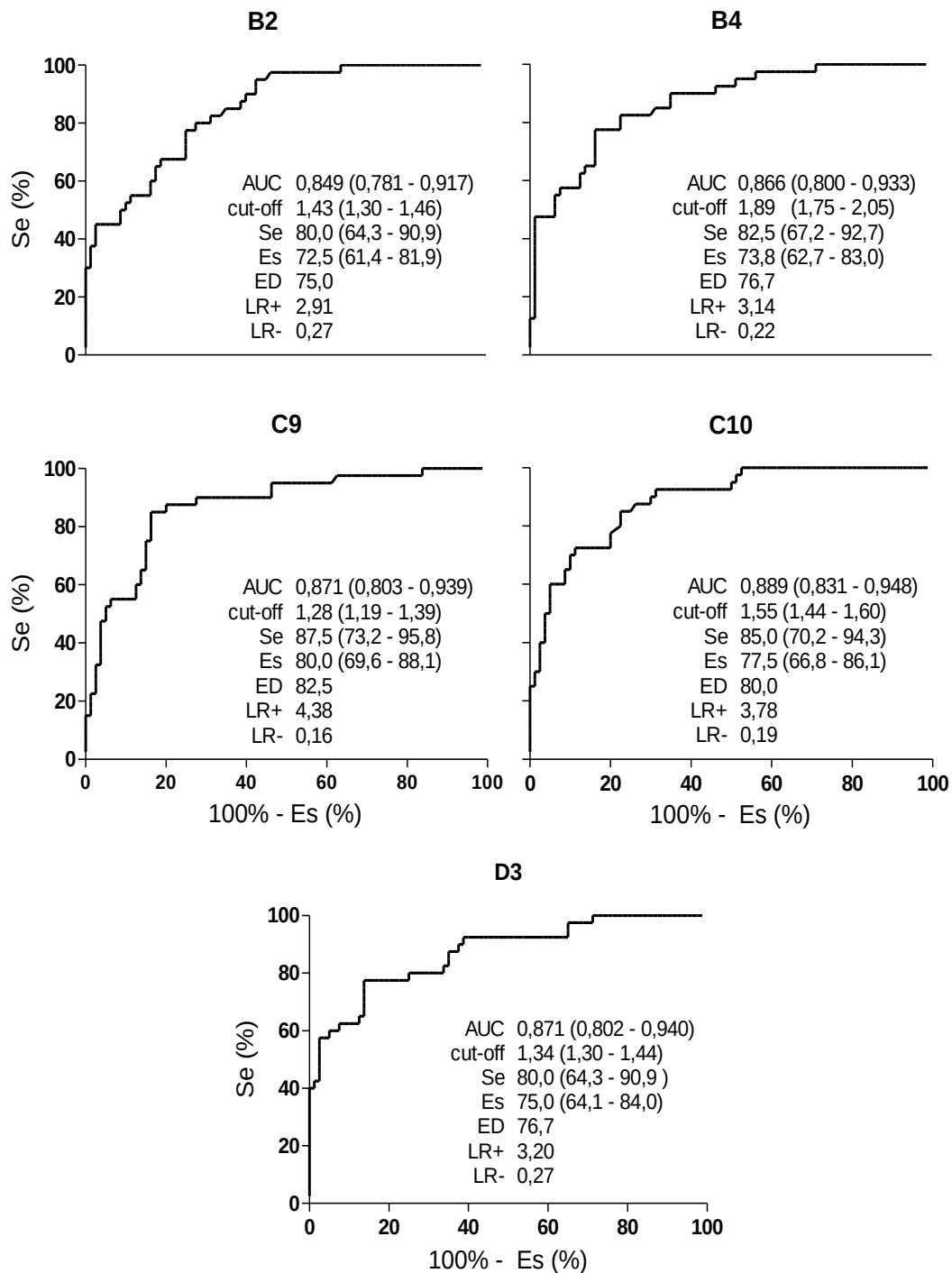


Figura 8. Curvas *receiver operating characteristic* (ROC) indicando *area under curve* (área sob a curva; AUC; $P < 0,05$), o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se, %), e especificidade (Es, %), com intervalo de confiança de 95%; eficiência de diagnóstico (ED, %) e razão de probabilidade + e - (*likelihood ratio*; LR) para os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 expressos na superfície dos fagos, na detecção de IgG em amostras de soro dos grupos: G1 – pacientes positivos para *estrongiloidíase* (n=40); G2 – pacientes acometidos por outras parasitoses (n=40) e G3 – pacientes aparentemente saudáveis (n=40).

Tabela 5. Reatividade cruzada pelo teste ELISA, em amostras de soro de pacientes com infecção por outros parasitos (Grupo 2) na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, utilizando como antígeno os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 expressos na superfície dos fagos.

Infecção	ELISA, n+ (%)				
	Fago B2	Fago B4	Fago C9	Fago C10	Fago D3
Ancilostomídeos (n=8)	2 (25,0)	1 (12,5)	0	1 (12,5)	1 (12,5)
<i>Ascaris lumbricoides</i> (n=7)	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,8)	2 (28,6)	3 (42,8)
<i>Enterobius vermicularis</i> (n=5)	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	2 (40,0)
<i>Giardia lamblia</i> (n=3)	0	0	0	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Hymenolepis nana</i> (n=7)	0	0	0	1 (14,3)	0
<i>Schistosoma mansoni</i> (n=3)	2 (66,6)	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0
<i>Taenia</i> sp. (n=5)	0	0	0	0	0
<i>Trichuris trichiura</i> (n=2)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0	1 (50,0)
Total (n=40)	9 (22,5)	7 (17,5)	5 (12,5)	7 (17,5)	8 (20,0)

n = amostras; n+ = número de amostras positivas

4.8. Phage-ELISA de competição

Para analisar a capacidade do peptídeo em mimetizar antígenos de *S. stercoralis*, um teste ELISA de competição com os cinco clones selecionados e o extrato total de *S. venezuelensis* foi realizado. A competição destes antígenos pela ligação à anticorpos IgG de *pool* de soro de pacientes com estrongiloidíase está representada na figura 9.

Os dados demonstraram que cada clone foi parcialmente inibido de maneira dose dependente à medida que o soro de pacientes com estrongiloidíase foi previamente incubado com concentrações crescentes de antígeno heterólogo. Em contraste, nenhuma inibição foi observada com o fago selvagem M13 (dados não mostrados). O controle negativo utilizado foi o fago selvagem M13 e o controle positivo, *pool* de soro de pacientes com estrongiloidíase. Estes dados indicam que os peptídeos expressos nos clones de fagos podem ser reconhecidos especificamente pelas IgGs anti-*Strongyloides* presentes no soro de pacientes com estrongiloidíase, e dessa forma mimetizar os epítomos presentes nas proteínas totais do extrato bruto do parasito.

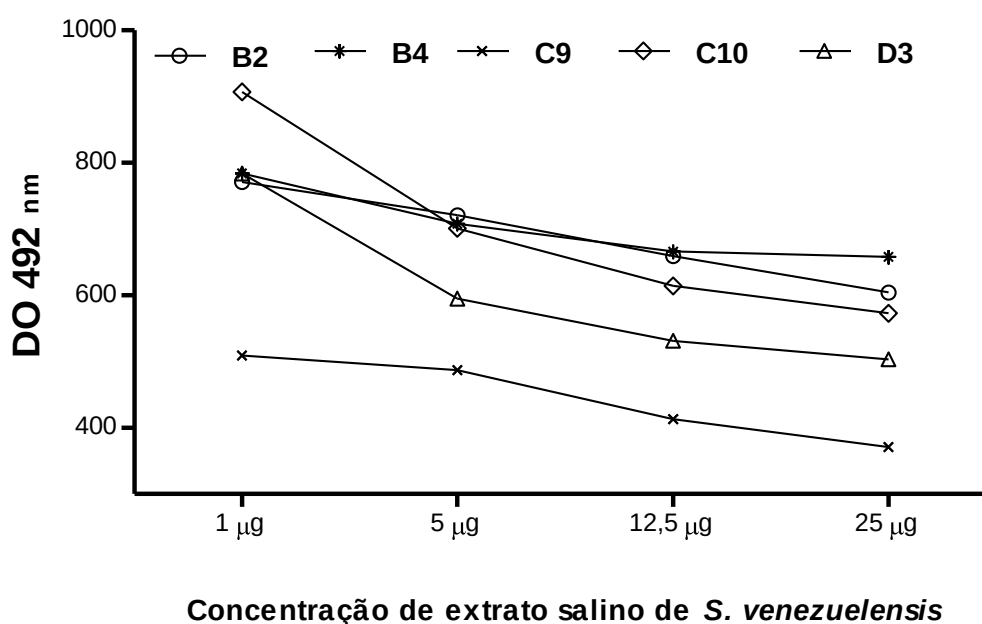


Figura 9. Phage-ELISA de competição dos clones de fagos selecionados B2, B4, C9, C10 e D3 testados com concentrações crescentes de extrato total heterólogo de larvas filarióides de *S. venezuelensis*.

4.9. Síntese química dos peptídeos expressos na superfície dos fagos selecionados

Os peptídeos sintéticos C9, C10 e D3 na forma liofilizada (5mg) foram submetidos à dissolução para dar início aos testes de validação. No entanto houve problemas com a dissolução do peptídeo sintético C9, e optou-se por dar andamento aos testes apenas com os peptídeos C10 e D3.

4.10. ELISA para verificação da imunogenicidade dos peptídeos sintéticos

A figura 10 representa a reatividade dos anticorpos IgG anti-*Strongyloides* circulantes no soro de pacientes dos 3 grupos de estudo contra os 2 peptídeos sintéticos C10 e D3. Os resultados foram expressos em índice de reatividade, e as amostras que apresentaram valores maiores que 1 foram consideradas positivas. A positividade ou negatividade individual de cada amostra de soro dos Grupos 1, 2 ou 3 pode ser verificada nas tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Tanto o peptídeo sintético C10 quanto D3 apresentaram ótima sensibilidade no teste, 95% das amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase tiveram as IgGs anti-*Strongyloides* detectadas pelos dois antígenos, sendo que apenas duas amostras não apresentaram reatividade suficiente, sendo consideradas falso negativas. A amostra de soro 10, foi detectada como falso negativa em ambos os peptídeos sintéticos (tabela 7).

A reatividade cruzada dos dois peptídeos com amostras de soro de pacientes acometidos por outras parasitoses (Grupo 2) pode ser verificada na tabela 6. Quando utilizado o peptídeo C10, este representou positividade de 20%. Essa reatividade foi bem menor quando testado o peptídeo D3, apresentando melhor especificidade em relação ao primeiro para este grupo de pacientes, apenas 12,5% das amostras, ou seja, cinco foram detectadas como falso positivas como verificado na tabela 8. Tanto o peptídeo sintético C10 quanto o D3 reagiram ao menos com uma amostra de soro de paciente infectado com ancilostomídeos, *A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *H. nana* ou *S. mansoni*. As amostras de soro número 7 (*A. lumbricoides*), 13 (*S. mansoni*), 21 (*H. nana*) e 36 (ancilostomídeo) foram detectadas como falso positivas para ambos os peptídeos, porém apresentaram reatividade menor quando na reação de ELISA foi utilizado o peptídeo D3 (figura 10).

No Grupo 3, quando testados a reatividade das IgGs circulantes em amostras de soro de pacientes aparentemente saudáveis, pode ser verificada reatividade cruzada correspondente

a 7,5% (3 amostras falso positivas) para o peptídeo C10, esta reatividade foi consideravelmente menor quando utilizado o peptídeo D3, ou seja, apenas uma amostra foi detectada como falso positiva, representando 2,5%. Estas amostras não coincidiram para os dois antígenos (tabela 9).

Curvas ROC, assim como o *cut-off* da reação, sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico e razão de probabilidade positiva e negativa estão apresentadas na figura 10.

Ambos apresentaram excelente potencial diagnóstico, com área sobre a curva igual a 0,965 e 0,961 para os peptídeos sintético C10 e D3, respectivamente. O peptídeo sintético D3 apresentou melhor eficiência de diagnóstico, com valor igual a 93,3%, e também melhor sensibilidade (95%) e especificidade (92,5%), além de melhores valores de razão de verossimilhança ($LR+ = 12,67$; $LR- = 0,05$).

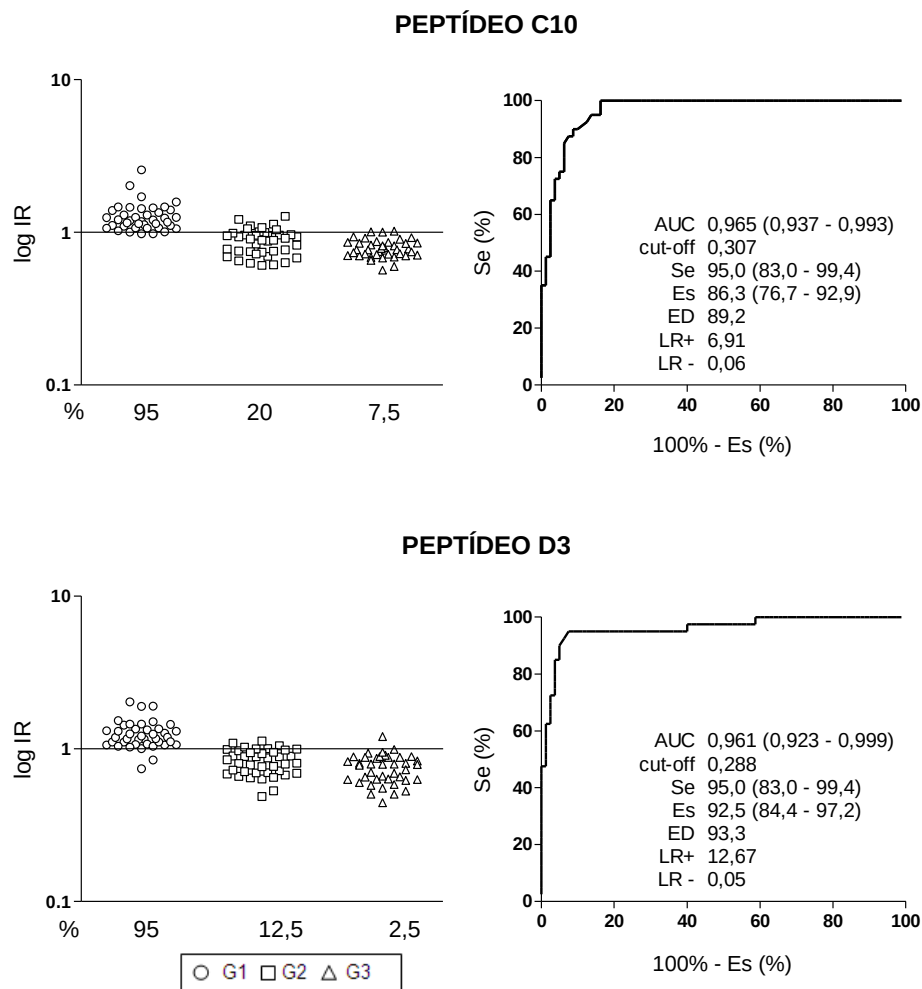


Figura 10. Detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* por ELISA em amostras de soro na diluição 1:160 dos indivíduos dos grupos G1 – pacientes positivos para estrongiloidíase (n=40); G2 – pacientes acometidos por outras parasitoses (n=40) e G3 – pacientes aparentemente saudáveis (n=40), utilizando como antígenos peptídeos sintéticos C10 e D3. Os valores estão expressos em índice de reatividade (IR) e a linha horizontal indica o ponto de corte da reação com IR = 1. Os resultados com IR > 1 foram considerados positivos. Curvas *receiver operating characteristic* (ROC) indicam *area under curve* (área sob a curva; AUC), *cut-off*, sensibilidade (Se, %), especificidade (Es, %), eficiência de diagnóstico (ED, %), razão de probabilidade + e - (*likelihood ratio*; LR) e % a porcentagem de resultados positivos.

Tabela 6. Reatividade cruzada pelos testes ELISA, em amostras de soro de pacientes com infecção por outros parasitos (Grupo 2) na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, utilizando como antígeno os peptídeos sintéticos C10 e D3.

Infecção	ELISA, N+(%)	
	Peptídeo C10	Peptídeo D3
Ancilostomídeos (n=8)	2 (25,0)	1 (12,5)
<i>Ascaris lumbricoides</i> (n=7)	1 (14,3)	1 (14,3)
<i>Enterobius vermicularis</i> (n=5)	2 (40,0)	0
<i>Giardia lamblia</i> (n=3)	0	0
<i>Hymenolepis nana</i> (n=7)	1 (14,3)	2 (28,57)
<i>Schistosoma mansoni</i> (n=3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Taenia</i> sp. (n=5)	1 (20,0)	0
<i>Trichuris trichiura</i> (n=2)	0	0
Total (n=40)	8 (20,0)	5 (12,5)

n = amostras; n+ = número de amostras positivas

Tabela 7. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com estrongiloidíase (Grupo 1) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 expressos na superfície dos fagos e os peptídeos sintéticos C10 e D3.

Amostra de soro	ELISA						
	Fago B2	Fago B4	Fago C9	Fago C10	Fago D3	Peptideo C10	Peptideo D3
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	-	-	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	-	+	+	+	+	+	+
14	+	-	-	-	-	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+
18	-	+	+	+	-	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	-	-	-	+	+
21	-	-	+	+	-	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	-	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	-	+
36	-	-	-	-	-	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+

- = Negativo; + = Positivo

Tabela 8. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com infecção por outras parasitoses (Grupo 2) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 expressos na superfície dos fagos e os peptídeos sintéticos C10 e D3.

	Amostra de soro/parasito	ELISA					
		Fago B2	Fago B4	Fago C9	Fago C10	Fago D3	Peptideo C10
							Peptideo D3
1	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	+	+	-
2	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
4	<i>A. lumbricoides</i>	-	+	+	-	+	-
5	<i>A. lumbricoides</i>	+	-	+	+	+	-
6	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	+
8	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	+
9	<i>E. vermicularis</i>	+	+	-	+	+	-
10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	+	-
11	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
12	<i>E. vermicularis</i>	+	+	+	-	-	+
13	<i>S. mansoni</i>	+	-	-	+	-	+
14	<i>S. mansoni</i>	+	+	-	-	-	-
15	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
16	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	+
17	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
18	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
19	<i>H. nana</i>	-	-	-	+	-	-
20	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
21	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	+
22	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
23	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
24	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
25	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
26	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
27	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	+
28	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
29	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	+	-	-
30	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	+	-
31	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
32	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
33	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
34	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
35	Ancilostomídeo	+	+	-	+	+	-
36	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	+
37	Ancilostomídeo	+	-	-	-	-	-
38	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	+
39	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-
40	<i>Trichuris</i> sp.	+	+	+	-	+	-

- = Negativo; + = Positivo

Tabela 9. Resultados dos testes ELISA dos 40 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno os peptídeos B2, B4, C9, C10 ou D3 expressos na superfície dos fagos e os peptídeos sintéticos C10 e D3.

Amostra de soro	ELISA						
	Fago B2	Fago B4	Fago C9	Fago C10	Fago D3	Peptideo C10	Peptideo D3
1	-	-	+	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	+	-
12	+	+	-	-	+	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	-	-
16	+	+	-	-	+	-	-
17	-	-	+	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	-	-
19	+	+	-	-	+	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-
21	+	+	+	+	+	-	-
22	+	+	+	+	+	+	-
23	-	-	+	+	-	-	-
24	-	-	-	-	+	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-
28	-	+	-	+	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	-	+	+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-
36	-	+	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	+	-
39	-	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-

- = Negativo; + = Positivo

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo no qual utilizou a técnica de *Phage display* para a seleção de mimotopos de *S. stercoralis* a serem empregados no aprimoramento do diagnóstico da strongiloidíase humana. A strongiloidíase é frequentemente sub-diagnosticada uma vez que em grande parte dos pacientes acometidos permanece assintomática. Testes diagnósticos convencionais baseados em exames parasitológicos apresentam limitações em relação à sensibilidade, devido à ausência de eliminação de ovos, eliminação intermitente de larvas nas fezes, além da baixa produção das mesmas na fase crônica da doença em pacientes assintomáticos, o que dificulta a detecção do parasito (DREYER et al., 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; GREINER; BETTENCOURT; SEMOLIC, 2008).

A detecção de anticorpos específicos contra *Strongyloides* por meio de testes imunológicos é de grande importância para o diagnóstico da strongiloidíase humana, pois complementa a análise parasitológica (COSTA-CRUZ et al., 1997; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004). No entanto, estes testes apresentam limitações no que diz respeito às dificuldades encontradas na obtenção de quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis* utilizadas nas preparações antigênicas empregadas, e também devido à reatividade cruzada com outros helmintos. As limitações encontradas no diagnóstico da strongiloidíase humana nos levaram a propor a utilização da tecnologia de *Phage display* como uma nova estratégia para desenvolver e selecionar novos antígenos capazes de detectar IgG anti-*Strongyloides* circulantes em pacientes infectados por *S. stercoralis*.

A escolha desta técnica se deve ao sucesso obtido em vários estudos na obtenção de diversas moléculas de interesse, como anticorpos (BARBAS et al., 1992; RADER; BARBAS, 1997; LIU et al., 2004;), peptídeos (NOREN; NOREN, 2001; HUTCHINSON et al., 2004; ANDRE et al., 2005; LANG et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010; MANHANI et al., 2011; VAN NIEUWENHOVE et al., 2012), enzimas (SOUMILLION, 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAY; HIGHSMITH, 2002; WILLATS, 2002). Em todas estas pesquisas o *biopanning* de biblioteca de fagos confirmou ser uma técnica adequada para a seleção e identificação de epítomos miméticos, os quais podem contribuir para a elucidação e identificação das bases moleculares do reconhecimento biológico. Além do mais, o fato de que mesmo apresentando poucos peptídeos recombinantes em sua superfície, bacteriófagos

podem ser utilizados como ferramentas para analisar e subsequentemente clonar o peptídeo de interesse com boa eficiência (GNANASEKAR; PADMAVATHI; RAMASWAMY, 2005).

Tecnologias emergentes baseadas em *Phage display* podem beneficiar diagnósticos através da produção de moléculas, as quais seriam inviáveis de se obter pelos métodos tradicionais. Constitui uma tecnologia vantajosa por ser de fácil e rápida execução e por não requerer a utilização de modelos experimentais em roedores. Peptídeos expressos na superfície de fagos selecionados podem mimetizar epítomos verdadeiros de *S. stercoralis*, sendo assim referenciados como mimotopos. A estratégia deste estudo consistiu em selecionar mimotopos com potencial diagnóstico avaliando soros policlonais de pacientes, bem como utilizar IgG purificada (IgG anti-*Strongyloides*) proveniente de pacientes infectados por *S. stercoralis* como alvo específico para o processo de seleção.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para separação de proteínas, porém as técnicas de separação por afinidade, com uso de substratos magnéticos têm se mostrado muito úteis, por ser uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgGs de boa qualidade utilizando pequena quantidade de amostra (SAFARIK; SAFARIKOVA, 2004). A escolha dos *beads* de proteína-G para a purificação das imunoglobulinas foi devido a correta orientação, que a proteína-G favorece ao anticorpo potencializando o seu uso (HÄRMÄ et al., 2000), bem como da baixa ligação inespecífica e contaminação das micropartículas (WHITEAKER et al., 2007), além da diminuição do impedimento estérico entre o anticorpo e o antígeno (KIM et al., 2009), quando se compara às seleções feitas em placas de poliestireno. Esta metodologia adotada para a captura de IgGs se mostrou eficiente neste trabalho.

A seleção dos fagos ligantes às IgGs anti-*Strongyloides* de pacientes com strongiloidíase foi realizada com a biblioteca de peptídeos expressos em fagos filamentosos M13 contendo sete aminoácidos conformacionais, a biblioteca Ph.D.-C7C (LEE et al., 2002), devido ao seu pequeno tamanho apresenta facilidade e precisão na ligação aos anticorpos.

A fim de minimizar a possibilidade de seleção de fagos inespecíficos, uma subtração dos mesmos foi realizada, mediante incubação da biblioteca de fagos com IgG de pacientes saudáveis e de pacientes com outras parasitoses, sendo os ligantes inespecíficos eliminados antes de uma nova incubação com o alvo de interesse. Este processo favoreceu uma maior especificidade aos fagos ligantes às IgGs anti-*Strongyloides*.

A estratégia de *Phage display* nos levou a selecionar 14 clones com diferentes sequencias entre si, sugerindo que os mesmos são epítomos imunodominantes presentes em proteínas principais que desencadearam uma resposta humoral contra a infecção por *S. stercoralis*. No entanto, apenas nove clones apresentaram similaridade com proteínas de *S.*

stercoralis de acordo com pesquisas no *GeneBank*, sendo elas proteínas envolvidas na sinalização (*nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone receptors superfamily*, SIDDIQUI et al., 2000), precursores enzimáticos (*aspartic protease precursor*, GALLEGO; SLADE; BRINDLEY, 1998), fatores de transcrição (*forkhead transcription factor 1*, MASSEY et al., 2003), metabolismo mitocondrial (*cytochrome c oxidase subunit I*, HU; CHILTON; GASSER, 2003) e proteínas imunorreativas (*IgG-immunoreactive zinc finger protein*, SIDDIQUI; STANLEY; BERK; 2001), entre outras.

No alinhamento entre as nove sequências selecionadas não foram encontradas similaridades perfeitas. Alguns autores relataram a falta de similaridades perfeitas dos peptídeos selecionados entre si, ou com proteínas já catalogadas (SANTAMARIA et al., 2001; DU et al., 2006; HU et al., 2006).

No teste de pré-validação por *Phage-ELISA*, ficou claro o potencial diagnóstico dos nove clones de fagos selecionados, pela comparação da reatividade com o fago selvagem, o qual apresentou reatividade bem inferior. Diante disto, supõe-se que os peptídeos expressos na superfície destes fagos são os responsáveis pela maior reatividade dos mesmos por ser o diferencial em relação ao fago selvagem. A partir deste pressuposto foi dado seguimento à validação dos clones de maior relevância, escolhidos com base na sua reatividade no teste de pré-validação, e no seu potencial em discriminar amostras de soro negativas daquelas de pacientes infectados pelo parasito, sendo eles os clones de fagos B2, B4, C9, C10 e D3. Todos os cinco apresentaram capacidade em distinguir pacientes infectados por *S. stercoralis* de indivíduos não infectados nos testes de validação diagnóstica por *Phage-ELISA*. Apresentaram valores de AUC (*area under curve*) maiores que 0,8, o que representa uma boa precisão do teste diagnóstico. Entre todos os clones, o fago C9 apresentou os melhores resultados para AUC (0,871), sensibilidade (78,5%) e especificidade (80%), seguido pelos fagos C10 e D3, que também apresentaram menor reatividade cruzada com soro de pacientes acometidos por outros parasitos. O fago C9 apresentou também maior valor de razão de verossimilhança positiva, consideravelmente bom e representa uma alta probabilidade de um verdadeiro diagnóstico positivo, enquanto seu menor valor de razão de verossimilhança negativa é adequado para descartar a possibilidade da doença.

A baixa reatividade cruzada observada no fago C9, com especificidade satisfatória (80%) sugeriu a sua utilização como antígeno promissor no diagnóstico sorológico da strongiloidíase humana, que também pode incluir o fago C10 (77,5%). Além disso, estes novos antígenos poderão ser utilizados rotineiramente em programas de investigação

epidemiológica, contribuindo diretamente para o controle e prevenção da doença, devido à facilidade na sua produção, e praticidade na utilização em imunoenaios simples.

No ensaio *Phage*-ELISA de competição observou-se uma redução da reatividade dos clones de fagos com o aumento da concentração de proteínas de *S. venezuelensis*, ou seja, de forma dose dependente. Diante disto, pode-se afirmar que os clones de fagos selecionados pela tecnologia de *Phage display* podem mimetizar epítomos de *S. stercoralis* e se ligar especificamente ao *pool* do soro de pacientes com estrogiloidíase. Optou-se por utilizar neste ensaio o extrato de *S. venezuelensis* por compartilhar muitos epítomos com *S. stercoralis*, além de ser utilizado com sucesso no diagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007, 2009; MACHADO et al., 2008b; FELICIANO et al., 2010; GONZAGA et al., 2013).

Diante dos resultados obtidos, foram escolhidos os fagos C9, C10 e D3 pelo seu melhor potencial diagnóstico, para a construção dos respectivos peptídeos sintéticos, realizada por síntese química dos peptídeos expressos em suas superfícies, a fim de se obter peptídeos livres das partículas virais, e assim obter mimotopos de maior especificidade. A construção dos peptídeos sintéticos foi esquematizado de acordo com o sistema de peptídeos antigênicos múltiplos (MAPS – *Multiple Antigenic Peptides*), o qual tem sido utilizado com sucesso na produção de alta titulação de anticorpos anti-peptídeo (POSNETT; MCGRATH; TAM, 1988; WANG et al., 1991) e de vacinas de peptídeo sintético (TAM, 1988). Infelizmente o peptídeo sintético C9 apresentou problemas na sua dissolução, o que impossibilitou seu emprego no ensaio ELISA, sendo validados apenas os peptídeos sintéticos C10 e D3.

Ambos apresentaram excelente potencial diagnóstico, superior aos clones de fagos. Apresentaram $AUC \geq 0,96$, sensibilidade de 95%, com performance diferenciada na especificidade. O peptídeo sintético D3 apresentou valor correspondente a 93,3%, e o peptídeo C10 86,3%. Desta forma, o peptídeo sintético D3 se destacou com excelente eficiência diagnóstica (93,3%), seguido pelo peptídeo sintético C10 (89,2%), além de melhores valores de razão de verossimilhança ($LR+ = 12,67$; $LR- = 0,05$). Os dois peptídeos correspondem a mimotopos com alto potencial antigênico, capazes de serem utilizados com sucesso em diversas técnicas imunológicas na detecção da estrogiloidíase humana.

Recentes avanços na imunologia de doenças infecciosas sugerem que um sorodiagnóstico eficiente requer alta antigenicidade de epítomos imunodominantes para ativar anticorpos a serem desenvolvidos na maioria, se não em todos os indivíduos infectados, desta forma o antígeno deve conter o epítomo ou seus substitutos, como moléculas que o mimetizam.

A introdução de ensaios imunológicos baseados em antígenos recombinantes que podem ser produzidos em grandes quantidades oferece alternativas atrativas à utilização de antígenos naturais, como extratos antigênicos produzidos a partir do parasito *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* ou *S. ratti*.

Sequências de peptídeos selecionados a partir de bibliotecas de fagos, contra anticorpos circulantes produzidos por infecção de microorganismos ou parasitos tem sido descrito como mimotopos para hepatite B (FOLGORI et al., 1994), HIV (PALACIOS-RODRIGUEZ et al., 2011), neurocisticercose (RIBEIRO et al., 2010; MANHANI et al., 2011; GAZARIAN et al., 2012), entre outros.

Outras investigações têm utilizado um antígeno recombinante de 31 KDa (denominado NIE) com precisão significativa no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana (RAMANATHAN et al., 2008; KROLEWIECKI et al., 2010), porém esses estudos avaliam a reatividade cruzada em grupo muito restrito, que consistia apenas de pacientes infectados com filaria. Em estudos de reatividade cruzada é imprescindível que possíveis antígenos sejam validados utilizando grupos de pacientes com maior heterogeneidade de infecções parasitárias, especialmente em regiões endêmicas, para desta forma confirmar a eficiência do antígeno específico ou teste diagnóstico.

Efetuiu-se uma abordagem abrangente a respeito da reatividade cruzada, todos os clones aqui selecionados por *Phage display* bem como os peptídeos sintéticos foram testados em um grupo com maior diversidade de pacientes acometidos por diferentes parasitos, e observou-se uma baixa reatividade cruzada, considerando a região endêmica onde doenças parasitárias são altamente prevalentes. Por esta razão, reações cruzadas entre os testes sorológicos para estrogiloidíase podem ocorrer, e geralmente são detectadas em pacientes infectados por *S. mansoni* e *Taenia* sp (LINDO et al., 1994; GROVE, 1996; SITHITHAWORN et al., 2003).

O fato de alguns indivíduos saudáveis serem reativos aos antígenos obtidos, sendo assim considerados falso positivos, pode ser explicado por uma possível exposição ao parasito *S. stercoralis* em algum momento anterior, sendo que a memória imunológica foi mantida e detectada pelos clones selecionados. No entanto, quando testados os peptídeos sintéticos, os casos falso positivos diminuíram consideravelmente. Desta forma, a utilização do peptídeo sintético seria excelente opção, por conter apenas moléculas miméticas ao parasito, livres das partículas virais dos fagos, conferindo assim testes sorológicos mais confiáveis, com melhor sensibilidade e menor reatividade cruzada.

Mais estudos estão sendo realizados para melhor explicar estes casos, a fim de discriminar infecção ativa por *S. stercoralis* dos casos suspeitos ou falso positivos nos testes sorológicos, e ainda para diferenciar infecções recentes das infecções mais antigas (GONZAGA et al., 2011).

Diferentemente das técnicas com maior nível de complexidade, inviáveis de serem empregadas em laboratórios mais simples, como o antígeno recombinante de 31 kDa, o qual é fusionado a luciferase por meio de cultura de células de mamíferos (RAMANATHAN et al., 2008; KROLEWIECKI et al., 2010), neste trabalho foi desenvolvido um ensaio com simples produção de antígeno recombinante por meio de cultura bacteriana e sua aplicação direta no sistema *Phage*-ELISA, técnicas que podem ser utilizadas em rotina laboratorial em laboratórios menos equipados.

Realizou-se a validação dos mimotopos por meio de teste ELISA por ser considerado um teste superior aos outros testes sorológicos no que diz respeito à praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes, além de apresentar alta sensibilidade em torno de 85% a 95% e especificidade que pode chegar a 90% na detecção de anticorpos circulantes em pacientes com estrogiloidíase (SCHAFFEL et al., 2001; KOOSHA; FESHARAKI; ROKNI, 2004; VAN DOORN et al., 2007). Dessa forma, o teste ELISA aliado a utilização de antígenos altamente sensíveis e específicos que possam ser produzidos com facilidade e sem alto custo, seria uma excelente alternativa no diagnóstico da estrogiloidíase humana e em estudos soropidemiológicos, e também no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico podendo ser executado com sucesso em laboratórios mais simples. O mimotopo peptídeo sintético D3, além da excelente sensibilidade correspondente a 95% apresentou especificidade superior, 92,5%.

Há a hipótese de que os peptídeos obtidos neste estudo também apresentem grande potencial para serem utilizados em ensaios vacinais, a fim de demonstrar que estes epitopos são capazes de induzir a produção de anticorpos anti-*S. stercoralis* neutralizantes em humanos, e dessa forma impedir o estabelecimento da infecção e progressão da doença. Estes novos biomarcadores são capazes de detectar anticorpos circulantes específicos em indivíduos acometidos pela estrogiloidíase, com razoável sensibilidade e especificidade quando utilizado o sistema fago-peptídeo, e com eficiência consideravelmente superior quando utilizado apenas o peptídeo na forma sintética.

Outro ponto que reforça a afirmativa de que os peptídeos obtidos se tratam de mimotopos de *S. stercoralis*, é o fato de apresentarem similaridade com proteínas do parasito dispostas no banco de dados *GeneBank*. O mesmo não acontece com o antígeno recombinante

NIE citado neste texto (RAMACHANDRAN et al., 1998). Mais investigações ainda devem ser realizadas a fim de melhorar a especificidade dos antígenos miméticos aqui obtidos.

Os epitopos expressos na superfície de fagos selecionados por *Phage display* oferecem uma alternativa a outros antígenos recombinantes. O uso de proteínas recombinantes obtidas por técnicas clássicas de engenharia genética para imunodiagnóstico exige maior infra-estrutura, é mais caro e mais trabalhoso quando comparada à produção de peptídeos em fagos. Os fagos após a seleção, podem ser “produzidos” em larga escala, pois ao infectarem uma bactéria, se multiplicam com facilidade e assim poderão ser dosados e utilizados como antígenos, tanto como fagos inteiros quanto como peptídeos sintetizados, no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores podem levar a novos métodos para o diagnóstico diferencial, e futuramente auxiliar na determinação do grau de infecção além da possibilidade de serem utilizados também no acompanhamento terapêutico.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível selecionar com sucesso cinco clones de fagos potencialmente antigênicos, e a partir deles produzir dois peptídeos sintéticos altamente sensíveis e específicos, todos validados por teste ELISA, constituindo importante fonte antigênica potencialmente aplicável no diagnóstico da estrogiloidíase humana;
- ✓ A alta sensibilidade e especificidade conferida aos peptídeos sintéticos no teste de validação, em especial ao peptídeo sintético D3, demonstraram seu alto potencial antigênico e a possibilidade de seu uso em testes imunodiagnósticos e talvez em ensaios vacinais futuros a fim de neutralizar uma possível infecção por *S. stercoralis*;
- ✓ A análise de bioinformática revelou que os peptídeos selecionados apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis* depositadas no *GeneBank*, demonstrando que a seleção de peptídeos reativos contra IgG anti-*Strongyloides* foi eficaz;
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho são promissores no que concerne ao uso de clones de fagos para a identificação de peptídeos específicos a serem utilizados com sucesso no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^a ed, RJ, Brasil, Elsevier Science, p. 75-96, 2003.

ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.

ADDA, C. G.; ANDERS, R. F.; TILLEY, L.; FOLEY, M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screen**, v.5, p. 1-15, 2002.

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

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford: C. A. B. International, p.650, 2000.

ANDRADE, E. C.; LEITE, I. C. G.; RODRIGUES, V. O.; CESCO, M. G. Parasitoses Intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **APS**, v. 13, p. 231-240, 2010.

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

ANDRE, S.; ARNUSCH, C.J.; KUWABARA, I.; RUSSWURM, R.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J.; PIETERS, R. J. Identification of peptide ligands for malignancy and growth regulating galectins using random phage display and designed combinatorial peptide libraries. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.563-573, 2005.

ARNDT, M. B.; JOHN-STEWART, T. G.; RICHARDSON, B. A.; SINGA, B.; VAN LIESHOUT, L.; VERWEIJ, J. J.; SANGARÉ, L. R.; MBOGO, L. W.; NAULIKHA, J. M.; WALSON, J. L. Impact of helminth diagnostic test performance on estimation of risk factors and outcomes in HIV-positive adults. **PLoS One**, v.8, p.e81915, 2013.

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

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

AZZAY, H.M.E.; HIGHSMITH, W.E. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v.35, p. 425-445, 2002.

¹ Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descritas em SILVA, A.M.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. Guia para normalização de trabalhos técnico-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações, teses. Uberlândia: EDUFU, 2002. 159p.

- BARBAS, C. F. III; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p. 4457-4461, 1992.
- BARBAS, C. F. III; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. **Phage display: A Laboratory Manual**. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BAERMANN, G. T. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomon (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mith H Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillula intestinalis*) nouveau ver nímatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de Cochinchine. **Compose Rend Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.
- BARBAS III, C. F.; BAIN, J. D.; HOEKSTRA, D. M.; LERDER, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proccedings of the National Academy of America**, v.89, p.4489-4457, 1992.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 1-33, 2001.
- BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **The Lancet**, v. 367, p. 1521-1532, 2006.
- BIGGS, B.; CARUANA, S.; MIHRSAHI, S.; JOLLEY, D.; LEYDON, J.; CHEA, L.; NUON, S. Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 788-791, 2009.
- 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.
- 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. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p. 545-551, 2007.
- BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em Fagos. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p. 44-51, 2002.
- CARVALHO, E. M.; PORTO, A. F. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Immunology**, v. 26, p. 487-497, 2004.
- CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and reviews of the literature. **Medicine**, v. 73, p. 256-263, 1994.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de Biossegurança em Laboratórios. Uberlândia:** Universidade Federal de Uberlândia, 55p.,1997.

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

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

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

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

DAVE, M.; PUROHIT, T.; RAZONABLE, R.; LOFTUS, E. V. JR. Opportunistic infections due to inflammatory bowel disease therapy. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.20, p.196-212, 2014.

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

DREYER, G.; E.; FERNANDES-SILVA, E.; ALVES, S.; ROCHA, A.; ALBUQUERQUE, R.; ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p.2569-2571, 1996.

DU, B.; QIAN, M.; ZHOU, Z.; WANQ, P.; WANQ, L.; ZHANQ, X.; WU, M.; ZHANQ, P.; MEI, B. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.342, p.956-962, 2006.

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

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

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

- FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 153-161, 2010.
- FEELY, N. M.; WAGHORN, D. J.; DEXTER, T.; GALLEN, I.; CHIODINI, P. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: difficulties in diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v.65, p.298-301, 2010.
- FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D. H.; SCHILTER, C.; SOUSA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRAO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasites Immunology**, v. 30, p. 139-149, 2008.
- FERREIRA, M. S. Infecções no hospedeiro imunocomprometido. In: COURA, J. R. (Ed). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; NUNES-ARAÚJO, F. F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.
- 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.
- FINNEY C. A. M.; TAYLOR M. DM.; WILSON M. S.; MAIZELS R. M. Expansion and activation of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 1874-1886, 2007.
- FOLGORI, A.; TAFI, R.; MEOLA, A.; FELICI, F.; GALFRE, G.; CORTESE, R.; MONACI, P.; NICOSIA A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **The EMBO Journal**, v.13, p. 2236-2243, 1994.
- GALLEGO, S. G.; SLADE, R. W.; BRINDLEY, P. J. A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*. **Acta Tropica**, v.71, p.17-26, 1998.
- GALIOTO, A. M.; HESS, J. A.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; LEE, J. J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5730-5738, 2006.
- GAZARIAN, K.; ROWLAY, M.; GAZARIAN, T.; VAZQUEZ BUCHELLI, J. E.; HERNÁNDEZ GONZÁLES, M. Mimotope peptides selected from phage display combinatorial library by serum antibodies of pigs experimentally infected with *Taenia solium* as leads to developing diagnostic antigens for human neurocysticercosis. **Peptides**, v.38, p.381-388, 2012.

GENTA, R. M. The immune regulation of intestinal helminthiasis. In: PARADISE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Enteric Infections and Immunity**. Nova York: Springer, p. 239-252, 1996.

GNANASEKAR, M.; PADMAVATHI, B.; RAMASWAMY, K. Cloning and characterization of a novel immunogenic protein 3 (NIP3) from *Brugia malayi* by immunoscreening of a phage-display cDNA expression library, **Parasitology Research**, v.97, p.49-58, 2005.

GNANASEKAR, M.; ANANDHARAMAN, V.; ANAND, S.B.; NUTMAN, T.B.; RAMASWAMY, K. A novel small heat shock protein 12.6 (HSP12.6) from *Brugia malayi* functions as a human IL-10 receptor binding protein. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.159, p. 98-103, 2008.

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

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 125, p. 338-341, 2010.

GONÇALVES, A. L. 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, 2012.

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

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, p. 69-75, 2013.

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

GREINER, K.; BETTENCOURT, J.; SEMOLIC, C. Strongyloidiasis: a review and update by case example. **Clinical Laboratory Science**, v. 21, p. 82-88, 2008.

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

GRYSCHKE, R.C. B.; SICILIANO, R. F. Estrongiloidíase In: VERONESI, R.; FOCACCIA R. VERONESI-FOCACCIA. **Tratado de Infectologia**, 4ª edição, cap.106. p. 1883-1889, 2010.

HAARD, H.; HENDERIKX, P.; HOOGENBOOM, H. R. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 5-31, 1998.

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

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

HÄRMÄ, H.; TARKKINEN, P.; SOUKKA, T.; LÖVGREN, T. Miniature single-particle immunoassay for prostate-specific antigen in serum using recombinant Fab fragments. **Clinical Chemistry**, v.46, p.1755-1761, 2000.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. T.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. Viruses: incredible nanomachines. **European Biophysics Journal**, v. 39, p.541-550, 2010.

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

HIRATA, T.; UCHIMA, N.; KISHIMOTO, K.; ZAHA, O.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; SAKUGAWA, H.; KINJO, F.; FUJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 246-249, 2006.

HIRATA, T.; NAKAMURA, H.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; KINJO, F.; YAMANE, N.; FUJITA, J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77 p. 683-684, 2007.

HOCHBERG, N. S.; MORO, R. N.; SHETH, A. N.; MONTGOMERY, S. P.; STEURER, F.; MCAULIFFE, I. T.; WANG, Y. F.; ARMSTRONG, W.; RIVERA, H. N.; LENNOX, J. L.; FRANCO-PAREDES, C. High prevalence of persistent parasitic infections in foreign-born, HIV-infected persons in the United States. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1034, 2011.

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

HU, M.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. The mitochondrial genome of *Strongyloides stercoralis* (Nematoda) -idiosyncratic gene order and evolutionary implications. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1393-1408, 2003.

HU, S.; GUO, X.; XIE, H.; DU, Y.; PAN, Y.; SHI, Y.; WANG, J.; HONG, L. HAN, S.; ZHANG, D.; HUANG, D.; ZHANG, K.; BAI, F.; JIANG, H.; ZHAI, H.; NIE, Y.; WU, K.; FAN, D. Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.341, p.964-972, 2006.

HUTCHINSON, O. C.; WEBB, H.; PICOZZI, K.; WELBURN, S.; CARRINGTON, M. Candidate protein selection for diagnostic markers of African trypanosomiasis. **Trends Parasitology**, v.11, p.519-523, 2004.

IRVING, M.B.; PAN, O.; SCOTT, J.K. Random peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.314-324, 2001.

JOHNSTONE, A. P.; THORPE, R. Immunochemistry in practice. **Blackwell Science**. p.318, 1987.

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

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

KIM, H. K.; AHN, K. C.; TECHERA, A. G.; SAPIENZA, G. G. G.; GEE, S. J.; HAMMOCKA, B. D. Magnetic beads-based phage anti-immunocomplex assay (PHAIA) for detection of the urinary biomarker 3-phenoxybenzoic acid to assess human exposure to pyrethroid insecticides. **Analytical Biochemistry**, v.386, p.45-52, 2009.

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

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M. B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidosis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 36-40, 2004.

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

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

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

KROLEWIECKI, A. J.; RAMANATHAN, R.; FINK, V.; MCAULIFFE, I.; CAJAL, S. P.; WON, K.; JUAREZ, M.; DI PAOLO, A.; TAPIA, L.; ACOSTA, N.; LEE, R.; LAMMIE, P.; ABRAHAM, D.; NUTMAN, T. B. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, p.1624-1630, 2010.

LANG, J. S.; ZHAN, J. B.; XU, L. H.; YAN, Z. K. Identification of peptide mimetics of xenoreactive alpha-Gal antigenic epitope by phage display. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, p.214-220, 2006.

LANZILLOTTI, R.; COETZER, T.L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends in Parasitology**, v.24, p. 18-23, 2008.

LAWRENCE, R. A.; ALLEN, J. E.; GREGORY, W. F.; KOPF, M.; MAIZELS, R. M. Infection of IL-4 deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a Th2 dominated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 5995-6001, 1995.

LEE, L.; BUCKLEY, C.; BLADES, M. C.; PANAYI, G.; GEORGE, A. J. T.; PITZALIS, C. Identification of synovium-specific homing peptides by in vivo phage display selection. **Arthritis & Rheumatism**, v.46, p.2109-2120, 2002.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. ed. Minneapolis: Burgess, p. 427, 1979.

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

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 7, p. 655-682, 1993.

LIU, B.; CONRAD, F.; COOPERBERG, M. R.; KIRPOTIN, D. B.; MARKS, J. D. Mapping tumor epitope space by direct selection of single-chain Fv antibody libraries on prostate cancer cells. **Cancer Research**, v.64, p.704-710, 2004.

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

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

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 781-789, 2004.

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998.

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

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

- MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7-14, 2008b.
- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SILVA, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COSTA-CRUZ, J. M.; FACCIOLI, L. H. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p.72-79, 2011.
- MANHANI, M. N.; RIBEIRO, V. S. ; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, v.33, p.322-329, 2011.
- MARCILLA, A.; SOTILLO, J.; PÉREZ-GARCIA, A.; IGUAL-ADELL, R.; VALERO, M. L.; S-ANCHEZ-PINO, M. M.; BERNAL, D.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; TRELLIS, M.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. **Parasitology**, v.14, p.1-7, 2010.
- MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectius disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 314-318, 2008.
- MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENCO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Fecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57-61, 2010.
- MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIBA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglicans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.
- MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; EL-MALKY, M.; OKAMURA, S.; AOKI, M.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; SHIMADA, S.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 179-185, 2002.
- MASSEY, H. C. JR.; NISHI, M.; CHAUDHARY, K.; PAKPOUR, N.; LOK, J. B. Structure and developmental expression of *Strongyloides stercoralis* fktf-1, a proposed ortholog of daf-16 in *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p.1537-1544, 2003.
- MCCARTY, T.R.; TURKELTAUB, J. A.; HOTEZ, P, J. Global progress towards eliminating gastrointestinal helminth infections. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 30, p.18-24, 2014.
- MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA-JÚNIOR, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there na association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus. **Acta Tropica**, v. 99, p. 102-105, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 320, 2005.

MONTEIRO, C. A.; ZUNIGA, H. P. P.; BENICIO, M. H. D. A.; SZARFA, S. C. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. Aspectos epidemiológicos, características socioeconômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 435-445, 1986.

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

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

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

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

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

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; PEREIRA, A. T. M.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.

NEUMANN, I.; RITTER, R.; MOUNSEY, A. *Strongyloides* as a cause of fever of unknown origin. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 25, p. 390-393, 2012.

NOREN, K. A.; NOREN, C. J. Construction of high-complexity combinatorial *Phage Display* peptide libraries. **Methods**, v.23, p. 169-178, 2001.

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

NORTHERN, C.; GROVE, D. I.; WARTON, A.; LOVEGROVE, F. T. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 75, p. 487-492, 1989.

OCHS, H. D.; WEDGWOOD, R.J. IgG subclass deficiencies. **Annual Review of Medicine**, v. 38, p. 325-340, 1987.

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.

OMS. The public health significance of ascariasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 465-466, 2004.

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

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p.97, 1991.

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

PALACIOS-RODRÍGUEZ, Y.; GAZARIAN, T.; HUERTA, L.; GAZARIAN, K. Constrained peptide models from phage display libraries highlighting the cognate epitope-specific potential of the anti-HIV-1 mAb 2F5. **Immunology Letters**, v.136, p.80-89, 2011.

PASQUALOTTO, A.C.; ZBOROWSKI MF, A. M.; POLONI, J. A.; SANTOS, A. P.; TORELLY, A. P. *Strongyloides stercoralis* in the urine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 106-107, 2009.

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

PAULA, F. M.; CASTRO, E. 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.

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.

PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 503-507, 2001.

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA-JUNIOR, J.; CARVALHO, E. M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 641-649, 2002.

POSNETT, D. N.; MCGRATH, H.; TAM, J. P. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 1719-1725, 1988.

RADER, C.; BARBAS III, C. F. *Phage display* of combinatorial antibody libraries. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.503-508, 1997.

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

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

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

REY, L. Parasitologia. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.

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

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

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.

ROBERTSON, M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alfa-subunit estodomain. Domain localization of the IgG-binding site. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, p.12736-12743, 1993.

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

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

- RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v. 128, p. 432-441, 2009.
- ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; TEIXEIRA, A. L.; BARROS-MAZON S.; TREVISAN R. C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 83-87, 1993.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.
- SAFARIK, L.; SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **Biomagnetic Research and Technology**, v.2, p.7, 2004.
- SANDOVAL, L.; MERCADO, R.; APT, W.; NAVARRETE, C.; CONTRERAS-LEVICOY, J.; UETA, M. T.; JERCI, M. I.; CASTILLO, D. Strongyloidosis no autóctona em Chile: Descripción de um brote familiar. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 59, p. 76-78, 2004.
- SANTAMARIA, H.; MANOUTCHARIAN, K.; ROCHA, L.; GONZALEZ, E.; ACERO, G.; GOVEZENSKY, T.; URIBE, L. I.; OLGUIN, A.; PANIAGUA, J.; GEVORKIAN, G. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from Papillomavirus-infected patients using Phage display Libraries. **Clinical Immunology**, v.101, p.296-302, 2001.
- SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 173-176, 1995a.
- SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 248-250, 1995b.
- 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 Disease**, v.7, p.e2288, 2013.
- SCHAFFEL, R.; NUCCI, M.; CARVALHO, E.; BRAGA, M.; ALMEIDA, L.; PORTUGAL, R.; PULCHERI, W. The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 346-350, 2001.
- SEGARRA-NEWNHAM, M. Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, p. 1992-2001, 2007.

SERGEeva, A.; KOLONIN, M. G.; MOLLDREM, J. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p.1622-1654, 2006.

SHORMAN, M.; AL-TAWFIQ, J. A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and Gram-negative sepsis in a patient with astrocytoma. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, p. 288-291, 2009.

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

SIDDIQUI, A. A.; STANLEY, C. S.; BERK, S. L. Isolation of a cDNA encoding an IgG immunoreactive antigen (zinc finger protein) of *Strongyloides stercoralis*. **Parasite**, v.8, p. 163,167, 2001

SIDDIQUI, A. A.; STANLEY, C. S.; SKELLY, P. J.; BERK, S. L. A cDNA encoding a nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Research**, v.86, p.24-29, 2000.

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

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

SITHITHAWORN, P.; SRISAWANGWONG, T.; TESANA, S.; DAENSEEKAEW, W.; SITHITHAWORN, J.; FUJIMAKI, Y.; ANDO, K. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, p.398-402, 2003.

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

SMOTHERS, J. F.; HENIKOFF, S.; CARTER, P. Affinity selection from biological libraries. **Science**, v. 298, p.621-622, 2002.

SOUMILLION, P.; JESPER, L.; BOUCHET, M.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; WINTER, G.; FASTREZ, J. Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. **Journal of Molecular Biology**, v.237, p.415-422, 1994.

STEINMANN, P.; ZHOU, X.; DU, Z.; JIANG, J.; WANG, X.; LI, L.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.1, p. 1-6, 2007.

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. 174-184, 2006.

- SUDRÉ, A. P.; SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G.; PERALTA, R. H.; MACEDO, H. W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1117-1723, 2007.
- TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 907-911, 1995.
- TAM, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 5409-5413, 1988.
- TURNER, J. D.; FAULKNER, H.; KAMGNO, J.; CORMONT, F.; VAN SNICK, J.; ELSE, K. J.; GRENCIS, R. K.; BEHNKE, J. M.; BOUSSINESQ, M.; BRADLEY, J. E. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **The Journal of Infectious diseases**, v. 188, p. 1786-1775, 2003.
- UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.
- VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, p. 8, 2006.
- VAIYAVATJAMAI, P.; BOITANO, J. J.; TECHASINTANA, P.; TUNGTRONGCHITR, A. Immunocompromised group differences in the presentation of intestinal strongyloidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 5-8, 2008.
- VAN DOORN, H. R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTAYN, J. C.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; VAN GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 438-442, 2007.
- VAN NIEUWENHOVE, L.; BÜSCHER, P.; BALHARBI, F.; HUMBERT, M.; DIJLTJENS, T.; GUISEZ, Y.; LEJON, V. Identification of mimotopos with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei gambiense* variant surface glycoproteins using human antibody fractions. **Plos Neglected Tropical Disease**, v.6, p.e1682, 2012.
- VELOSO, M. G.; PORTO, A. S.; MORAES, M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: autopsy case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 413-415, 2008.
- VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A. T.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 342-346, 2009.
- VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. 2007. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook: the C. elegans Research Community**. Disponível em: <http://www.wormbook.org>. Acesso em 05 de dezembro de 2013.

WANG, C. Y.; LOONEY, D. J.; LI, M. L.; WALFIELD, A. M.; YE, J.; HOSEIN, B.; TAM, J. P.; WONG-STAAAL, F. Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen. **Science**, v. 254, p.285-288, 1991.

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

WHITEAKER, J. R.; ZAO, L.; ZHANG, H. Y.; FENG, L.; PIENING, B. D.; ANDERSON, L.; PAULOVICH, A. G. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. **Analytical Biochemistry**, v.362, p.44-45, 2007.

WILLATS, W. G. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Molecular Biology**, v.50, p.837-854, 2002.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 5 ed., 2002.