MARCELO ANDREETTA CORRAL

**Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento do diagnóstico
sorológico da estrogiloidíase humana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek
Coorientadora: Dra. Fabiana Martins de Paula

**São Paulo
2018**

MARCELO ANDREETTA CORRAL

**Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento do diagnóstico
sorológico da estrogiloidíase humana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek
Coorientadora: Dra. Fabiana Martins de Paula

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corral, Marcelo Andreetta
Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento do
diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana /
Marcelo Andreetta Corral. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek.
Coorientadora: Fabiana Martins de Paula.

Descritores: 1.Strongyloides stercoralis
2.Antígenos de helmintos 3.Proteômica 4.Testes
imunológicos 5.Ensaio de imunoadsorção enzimática
6.Western blotting

USP/FM/DBD-436/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais

Heloisa Helena Andreetta Corral

José Mario Garcia Corral

"Não morrem os que deixam

o afeto como herança. "

À memória do meu avô Aldo Andreetta

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças e inspiração para realizar essa tese de Doutorado.

Ao programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente na figura do meu orientador Prof. Associado Ronaldo Cesar Borges Gryscek e da minha coorientadora Dra. Fabiana Martins de Paula pela oportunidade e orientação no desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni, ao Prof. Dr. Giuseppe Palmisano e à Profa. Associada Silvia Figueiredo Costa pelos valiosos conselhos e orientações no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Basile, minha professora inesquecível! Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com a senhora. Me fez perceber o quão incrível é a educação e seu poder de mudar as pessoas para que possam transformar o mundo! Todo meu respeito e admiração pelo seu trabalho e pela forma como conduz brilhantemente seus ideais em sala de aula.

A todos os docentes e orientadores do Programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, especialmente Profa. Associada Anna Sara Levin, Profa. Associada Silvia Figueiredo Costa, Dra. Silvia Maria Fátima di Santi, Prof. Associado Edson Abdala, Prof. Associado Francisco Oscar França, Profa. Associada Ana Marli Sartori e Prof. Titular Aluísio Augusto Cotrim Segurado. Obrigado por acreditarem nas minhas ideias no período de representação discente e por promoverem a ciência e o conhecimento me motivando cada vez mais nessa jornada acadêmica! Todo meu respeito e gratidão.

À Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni e a Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin por permitirem que eu realizasse o PAE junto à disciplina de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas e por acreditarem no poder da educação. Vocês são exemplos a serem seguidos!

À Dra. Dirce Mary Correia Lima Meisel. Sua ajuda foi fundamental em todos os aspectos da construção dessa tese, desde os experimentos na bancada laboratorial à palavra amiga nos momentos difíceis. Uma grande amiga que levarei para vida, pois sem você, definitivamente não teria conseguido! Obrigado! Todo meu respeito, admiração e gratidão.

À Dra. Débora Levy e Prof. Associado Sérgio Paulo Bydlowisk pela parceria que desenvolvemos, sobretudo na realização do gel 2D e nas análises quimioluminescentes.

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges pelos valiosos conselhos e orientações no desenvolvimento dos testes proteômicos que realizamos nessa tese de Doutorado. Todo meu respeito e profunda admiração.

À Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano pela convivência e pelas ideias trocadas nesse período do doutorado.

À Ma. Gabriela Rodrigues e Fonseca pelo companheirismo durante todos esses anos. Você é incrível! Obrigado por me ajudar a concretizar aquelas ideias que pareciam ser as mais loucas, mas que juntos conseguimos fazer com que tudo parecesse fácil e acessível!

Ao Me. Lauro Perdigão Vieira Neto e à Ma. Natalia Barros Cerqueira pela parceria na concretização do III e IV Workshops em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

À Ma. Maiara Gottardi, minha grande parceira “estrongiloidísta”! Nosso período de convivência no laboratório durante o doutorado foi curto, mas isso não nos impediu de compartilharmos nossas conquistas e realizações pessoais. Amiga, obrigado por tudo, o laboratório não foi o mesmo sem você!

À Dra. Tatiane Assone dos Santos, a amiga que o mestrado me deu e perseverou comigo durante todo o período do doutorado. Obrigado por todos nossos almoços e conversas descontraídas!

À Dra. Fernanda Bertuccez Cordeiro pelo companheirismo na Escola Brasileira de Espectrometria de Massas, na ajuda inicial com os experimentos proteômicos, compartilhamento de experiências além da amizade que desenvolvemos ao longo desses anos. Não poderia deixar de agradecer a amizade e companheirismo da Dra. Livia do Vale, Me. Eduardo Lana e Me. Guilherme Rabelo Coelho. Conhecer vocês foi a melhor parte de Natal!

A todos os alunos de pós-graduação e estagiárias do meu grupo de pesquisa e aqueles que agreguei nessa nova jornada: Ana Kathleen Borges, Ma. Ana Paula Marques Rosin, Gabriela Cristina de Oliveira Godinho, Gabriela Lima de Alvarenga, Ma. Gessica Baptista de Melo, Maria Eduarda Rodrigues Chierato, Natália Albuquerque Soares, Ma. Priscilla Duarte Marques Fonseca e Me. William Henry Roldán Gonzales. Amigos vocês foram sensacionais. Muito obrigado por tudo, principalmente pelo convívio no laboratório.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose e outras parasitoses (LIM-06) pelo auxílio técnico e por permitir que eu desenvolvesse meu trabalho com vocês. Especialmente à Dra. Ana Maria

Gonçalves da Silva, Francisca de Fátima Valentim, Maria Cristina Conceição Melo e Dra. Maria Cristina Carvalho do Espírito-Santo.

À Roseli Antonia Santo, secretária do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, sua ajuda com palavras amigas e as dicas foram fundamentais para eu chegar até aqui (mais uma vez)! Agradeço também a todo serviço da Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A toda minha família por me aguentarem nesse período de doutoramento, especialmente aos meus pais Heloisa Helena Andreetta Corral e José Mario Garcia Corral, que sempre me incentivaram a buscar e alcançar meus sonhos. Devo tudo a vocês! Esse título também é nosso! Amo vocês! Todo meu carinho, respeito e profunda admiração.

Ao Lucas Domingues Alencar Alcântara por tudo que você representa para mim! Sem você e seu apoio incondicional não teria conseguido chegar onde cheguei, mesmo diante de todas as adversidades e experimentos nos finais de semana! Por isso e por tudo que você é, te amo! A você todo meu carinho, respeito, admiração e amor!

Um agradecimento especial a todos os meus familiares que certamente entenderam minha ausência todo esse período. Especialmente à Maria de Fátima da Silva, que sempre possui uma palavra de conforto e carinho me incentivando em todos os momentos da vida, desde sempre. As minhas avós, todos os tios e todos os primos. Preciso destacar meus primos queridos Anna Julia Bucciarelli Andreetta, André Bucciarelli Andreetta e Maria Eduarda Pereira

Andreetta, obrigado por fazerem parte da minha vida, vocês não imaginam o quão especiais são para mim!

A todos meus amigos pela paciência, carinho, amizade e por todo tipo de apoio que compartilharam comigo durante essa jornada. Obrigado por sempre torcerem por mim e acompanharem mais essa etapa da minha vida. Um agradecimento especial para Carolina Amie Degaki Haniuda e Camila Yoko Cintho: as irmãs que escolhi ter na minha vida há mais de 20 anos. Amigas, vocês foram meu alicerce durante esse período. Obrigado pelo apoio incondicional e por fazerem a diferença. Agradeço também o companheirismo do Renato Yamaki Kaibara. Amo vocês! Não tenho dúvidas ao dizer que vocês são minha família nipônica!

Ao Me. Ivan Henrique Yoshida representando a minha tão amada Biomedicina Santo Amaro! Amigo, obrigado por todo companheirismo nesse período, principalmente por estar sempre presente na minha vida!

À Juliane Tatiane Pereira Pimentel. Não caberiam palavras para expressar todo meu carinho, amor e consideração por você minha amiga! Obrigado por estar sempre presente em cada momento da minha vida!

À Ma. Caroline Furtado Noble por todos os momentos que passamos nessa jornada: dos mais complexos, aos nossos encontros internacionais! Obrigado por sempre estar presente na minha vida, mesmo a 12.226 Km de distância!

À Graziela Mendes Pereira Souza e à Aline Pimentel Zanzeri pela amizade de longa data. Obrigado por sempre torcerem pela minha formação. Vocês são incríveis.

À Letícia Claudi de Oliveira, Helena Núbia de Oliveira e Ma. Lais Calissi
Brisola Tavares pela parceria que fizemos desde o Workshop que acabou
virando uma bela e divertida amizade, que espero que seja para vida toda!

A todos meus alunos! Vocês foram, são e sempre serão minha fonte de
inspiração! Obrigado pelos momentos que compartilhamos! Vocês foram
fundamentais na construção da minha carreira docente!

À FAPESP e à CAPES por acreditarem e concederem auxílio à pesquisa
para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

"A educação não transforma o mundo.

A educação muda as pessoas.

As pessoas transformam o mundo. "

Paulo Freire

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviatura, símbolos e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MÉTODOS	13
3.1 Caracterização do antígeno heterólogo de <i>Strongyloides venezuelensis</i> ...	15
3.1.1 Aspectos éticos na experimentação animal.....	15
3.1.2 Manutenção da cepa de <i>S. venezuelensis</i>	15
3.1.3 Obtenção dos parasitos.....	15
3.1.4 Obtenção das frações antigênicas.....	16
3.1.5 Caracterização das frações antigênicas.....	16
3.2 Imunodiagnóstico.....	18
3.2.1 Aspectos éticos em pesquisa envolvendo seres humanos.....	18
3.2.2 Casuística.....	18
3.2.2.1 População imunocompetente.....	18
3.2.2.2 <i>Pool</i> de soros.....	21
3.2.2.3 População imunocomprometida.....	21
3.2.3 ELISA.....	22
3.2.4 DOT ELISA.....	23
3.2.5 Western-blotting.....	24
3.3 Imunoproteômica.....	25
3.3.1 Identificação de proteínas	25
3.3.2 Digestão triptica e identificação de proteínas por espectrometria de massa	25
3.4 Utilização da galectina como fonte antigênica.....	26
3.4.1 Purificação da fração antigênica em coluna de galectina.....	26
3.4.2 Caracterização das frações purificadas.....	26
3.4.3 ELISA utilizando as frações purificadas.....	27
3.5 Normas de Biossegurança.....	27
3.6 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Caracterização do antígeno heterólogo de <i>Strongyloides venezuelensis</i> ..	30
4.2 Imunodiagnóstico.....	32
4.2.1 Validação das técnicas imunoenzimáticas – ELISA e DOT ELISA em amostras de pacientes imunocompetentes.....	32
4.2.1.1 ELISA	32

4.2.1.2 DOT ELISA	34
4.2.1.3 Correlação entre ELISA e DOT ELISA.....	37
4.2.2 Aplicação das técnicas imunoenzimáticas – ELISA e DOT ELISA em amostras de pacientes imunodeprimidos.....	38
4.2.2.1 ELISA	38
4.2.2.2 DOT ELISA dos pacientes imunodeprimidos.....	39
4.2.2.3 Correlação entre ELISA e DOT ELISA.....	40
4.2.3 Western-blotting.....	41
4.2.4 <i>Western-blotting</i> dos pacientes imunodeprimidos.....	45
4.2.5 <i>Western-blotting</i> 2D.....	48
4.3 Imunoproteômica.....	49
4.3.1 Identificação de proteínas gel 1D.....	49
4.3.2 Identificação de proteínas gel 2D.....	52
4.4 Utilização da galectina como fonte antigênica.....	55
4.4.1 Caracterização das frações purificadas.....	55
4.4.2. Western-blotting anti-galectina.....	56
4.4.3 ELISA.....	57
4.4.4 ELISA dos pacientes imunodeprimidos.....	59
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	72
7 REFERÊNCIAS	74
Apêndices	90
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	91
Apêndice B – Parecer do Comitê de ética.....	94
Apêndice C – Parecer do Comitê de ética	97
Apêndice D – Artigo Publicado	98
Apêndice E – Artigo Submetido para publicação	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	microgramas
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
<	Menor que
>	Maior que
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cm	centímetros
Cm ²	centímetros quadrados
Cut-off	Frequência absoluta do corte
DAB	3,3'- Diaminobenzidina
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
<i>g</i>	giros
g	gramas
Gal	galectina
h	hora
H ₂ SO ₄ 2N	Ácido Sulfúrico 2 Normal
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-I	Vírus Linfotrópico Humano tipo I
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
kDa	Kilodalton
L1	Larvas rabditoides
L3	Larva filarioide infectante
LIM-06	Laboratório de Investigação Médica 06 (Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose e outras parasitoses)
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligramas
min	minutos
mL	mililitros
mM	Milimolar
MM	Padrão de massa molecular
n	número
N	negativos
NL	Não Ligado
Nm	nanômetros
OP	Outros parasitos e comensais
P	positivos para <i>Strongyloides stercoralis</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino acrescido de 0,05% tween 20
PBS-TM	Tampão fosfato-salino 0,05% tween 20% com 3% de leite desnatado em pó
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVDF	polyvinylidene difluoride
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Rpm	rotações por minuto
S+ID	Pacientes positivos para <i>S. stercoralis</i> imunodeprimidos
S-ID	Pacientes negativos para <i>S. stercoralis</i> imunodeprimidos
SDS	Dodecil sulfato de sódio

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TM	Antígeno de membrana de <i>S. venezuelensis</i>
TS	Antígeno solúvel de <i>S. venezuelensis</i>
Tris	2- amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
V	Volts
X	vezes
WB	<i>Western blotting</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i> : (1) L1 eliminadas pelas fezes; (2) Desenvolvimento de adultos de vida livre; (3) Ovos são produzidos por fêmeas de vida livre; (4) Desenvolvimento de larva rhabditoide a partir de ovos embrionados; (5) Transformação L1 em L3; (6) Penetração da L3 na pele; (7) L3 é carregada pelo sistema circulatório e pulmões, ocorre a migração da larva para a faringe, as larvas deglutidas chegam ao intestino transformando-se em fêmeas partenogenéticas; (8) Fêmeas adultas no intestino; (9) Os ovos são depositados na mucosa intestinal e as larvas migram para luz intestinal.....	4
Figura 2 – Fluxograma dos experimentos realizados na condução do estudo a partir de amostras biológicas de pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos	14
Figura 3 – SDS-PAGE 1D 12% corado por <i>Coomassie Blue</i> indicando perfil proteico das frações solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	30
Figura 4 – SDS-PAGE 2D 12% corados por <i>Coomassie Blue</i> indicando perfil proteico das frações solúvel (TS) (A) e de membrana (TM) (B) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	31
Figura 5 – Curvas ROC, segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações solúveis TS (A) e de membrana TM (B) de <i>S. venezuelensis</i> . As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos (n=20) em relação aos indivíduos negativos (n=27) e com outras parasitoses (n=22)	32
Figura 6 – Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) por ELISA utilizando as frações antigênicas solúvel - TS (A) e de membrana - TM (B) de <i>S. venezuelensis</i> . Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo	33
Figura 7 – DOT ELISA revelado utilizando DAB como substrato em diferentes diluições do soro e do conjugado em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) utilizando a fração antigênica de membrana - TM de <i>S. venezuelensis</i>	35

Figura 8 – DOT ELISA revelado com substrato quimioluminescente nas amostras de soro diluídas 1:5000 e conjugado 1:50000 utilizando a fração antigênica de membrana - TM de *S. venezuelensis*. 1, 2 e 3 pacientes positivos para *S. stercoralis* (grupo P); 4: paciente com Ancilostomídeo (grupo OP); 5: paciente com *A. lumbricoides* (grupo OP); 6 negativo (grupo N) 36

Figura 9 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID, n=32, (A)) e negativos (S-ID, n=27, (B)) para *S. stercoralis* utilizando as frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo 38

Figura 10 – DOT ELISA utilizando a fração antigênica TM em pacientes do imunodeprimidos positivos (S+ID) e negativos (S-ID) para *S. stercoralis* revelado com quimioluminescência. 1: paciente candidato a transplante renal positivo para *S. stercoralis*; 2: paciente portador do vírus HTLV positivo para *S. stercoralis*; 3: paciente com câncer positivo para *S. stercoralis*; 4: paciente candidato a transplante de medula óssea negativo para *S. stercoralis*; 5: paciente portador do vírus HIV negativo para *S. stercoralis*; 6: paciente candidato a transplante de fígado negativo para *S. stercoralis* 39

Figura 11 – *Western-blotting* 1D utilizando as frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. 1: amostra positiva para *S. stercoralis*; 2: amostra com *S. mansoni*; 3: amostra negativa para quaisquer parasitos. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons 42

Figura 12 – Intensidade de marcação da membrana de PVDF após a reliazação do Western-Blotting em pacientes imunocompetentes (grupo P) e imunocomprometidos (grupo S+ID), usando frações de antígeno solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, respectivamente..... 47

Figura 13 – *Western-blotting* 2D utilizando como antígeno a fração solúvel (TS) de larva de *S. venezuelensis*. Foram utilizados *pool* soros de indivíduos dos grupos P (*S. stercoralis*), OP (*S. mansoni*) e N (negativo) na reação de WB 2D 48

Figura 14 - *Western-blotting* 2D utilizando como antígeno a fração de membrana (TM) de larva de *S. venezuelensis*. Foram utilizados *pool*

soros de indivíduos dos grupos P (*S. stercoralis*), OP (*S. mansoni*) e N (negativo) na reação de WB 2D 48

Figura 15 – Géis réplica 1D corado por Coomassie Blue das frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) indicando local da excisão das bandas destinadas à identificação por espectrometria de massas. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons 49

Figura 16 – Géis réplica 2D corados por *Coomassie Blue* das frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) indicando local da excisão das bandas (numeradas) destinadas à identificação por espectrometria de massas. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons 52

Figura 17 – SDS-PAGE 12% corado por Nitrato de Prata indicando perfil proteico das frações solúvel (TS), Não ligada (NL) e galectina (Gal). MM: Padrão de Massa Molecular; TS: fração antigênica solúvel; NL: fração Não ligada; Gal: Galectina 55

Figura 18 – Western-blotting revelado por substrato Quimioluminescente utilizando a fração Galectina (Gal). MM: Massa molecular. KDa: Quilodaltons 56

Figura 19 – Curvas ROC, segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações não ligada - NL (A) e Galectina - Gal (B) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses 57

Figura 20 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) por ELISA utilizando as frações antigênicas não ligada (NL) e galectina (Gal) derivadas de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo 58

Figura 21 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID, n=32) e negativos (S-ID, n=27) para *S. stercoralis* utilizando as frações antigênicas não ligada (NL) e galectina (Gal) derivadas de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reatividade das amostras de soros dos pacientes imunocompetentes em relação as técnicas ELISA e DOT ELISA utilizando fração antigênica de membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	37
Tabela 2 – Reatividade das amostras de soros dos pacientes imunodeprimidos em relação as técnicas ELISA e DOT ELISA utilizando fração antigênica de membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	40
Tabela 3 – Frequência de reatividade de amostras de soro no <i>Western-blotting</i> utilizando as Frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	43
Tabela 4 – Reatividade (pacientes do grupo P, n=20), reatividade cruzada (pacientes do grupo OP, n=22) ou reatividade inespecífica (pacientes do grupo N, n=27) das amostras de soros em relação as bandas imunogênicas das frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> , observadas no <i>Western-blotting</i> . ..	44
Tabela 5 – Frequência de reatividade de amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID) e negativos (S-ID) para <i>S. stercoralis</i> no <i>Western-blotting</i> utilizando as frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	46
Tabela 6 – Proteínas identificadas na fração solúvel de larvas filarioides (TS) de <i>S. venezuelensis</i> . Para este estudo foram utilizados o termo <i>Strongyloides</i> para busca no uniprot (www.uniprot.org) e as proteínas foram identificadas por dois peptídeos com intervalo de confiança de 95%. As proteínas presentes na tabela apresentaram abundância >2% ..	50
Tabela 7 – Proteínas identificadas na fração de membrana de larvas filarioides (TM) de <i>S. venezuelensis</i> . Para este estudo foram utilizados o termo <i>Strongyloides</i> para busca no uniprot (www.uniprot.org) e as proteínas foram identificadas por dois peptídeos com intervalo de confiança de 95%. As proteínas presentes na tabela apresentaram abundância >2%	51
Tabela 8 – Proteínas selecionadas e identificadas na fração antigênica solúvel de larvas filarioides (TS) de <i>S. venezuelensis</i> a partir da análise do <i>Western-blotting</i> bidimensional utilizando pool de soros de indivíduos positivos, com outras parasitoses e negativos.	53

Tabela 9 – Proteínas selecionadas e identificadas na fração antigênica de membrana de larvas filarioides (TM) de *S. venezuelensis* a partir da análise do *Western-blotting* bidimensional utilizando pool de soros de indivíduos positivos, com outras parasitoses e negativos. 54

RESUMO

Corral MA. *Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento do diagnóstico sorológico da strongiloidíase humana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Estrongiloidíase é a infecção parasitária causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. Em indivíduos imunocompetentes cursa de forma crônica e assintomática na maioria dos casos; entretanto em imunocomprometidos pode assumir as formas graves como a hiperinfecção e/ou strongiloidíase disseminada. Diante da baixa sensibilidade do diagnóstico parasitológico, vêm sendo realizadas pesquisas envolvendo o imunodiagnóstico, sobretudo voltadas para variações na obtenção das frações antigênicas heterólogas utilizando *Strongyloides venezuelensis* como fonte de antígeno. O presente trabalho teve como objetivo aprimorar o diagnóstico sorológico da strongiloidíase humana utilizando técnicas imunoproteômicas. Foram utilizadas amostras de fezes e soro de indivíduos imunocompetentes, divididos em três grupos de acordo com o resultado do exame parasitológico (P: positivos para *S. stercoralis*; OP: com outras parasitoses; N: negativos para quaisquer parasitos ou comensais) e imunocomprometidos divididos em dois grupos de acordo com o resultado do exame parasitológico (S+ID: positivos para *S. stercoralis* e S-ID: negativos para *S. stercoralis* ou qualquer parasito). As amostras de soro dos cinco grupos de pacientes foram submetidas a testes sorológicos a partir das frações antigênicas heterólogas de *S. venezuelensis* solúvel (TS) e de membrana (TM) utilizando as técnicas ELISA, DOT ELISA e Western-blotting. O ELISA apresentou 95% de sensibilidade em ambas frações antigênicas e 91,8% e 93,8% de especificidade para TS e TM, respectivamente. A técnica foi capaz de detectar anticorpos anti-*Strongyloides* em 34,4% e 28,1% em pacientes do grupo S+ID utilizando os antígenos TS e TM, respectivamente. O DOT ELISA foi executado somente com a fração TM e apresentou 95% de sensibilidade e 85,7% de especificidade detectando 28,1% de positividade no grupo S+ID. A banda de 40-35 KDa foi a única frequente em todos indivíduos do grupo P e a mais frequente em pacientes S+ID (62,5% para TS e 53,1% para TM). Géis réplicas foram realizados, excisados nas regiões de identificação proteica e submetidos a identificação de proteínas por espectrometria de massas. As proteínas mais abundantes nas frações antigênicas TS e TM foram actina e galectina. A fração TS foi purificada em coluna de afinidade para galectina, dada sua capacidade de modulação do sistema imunológico. As frações não ligada (NL) e galectina (Gal) foram utilizadas como antígenos na técnica ELISA apresentando 90% de sensibilidade e 89,8 e 75% de especificidade para NL e Gal, respectivamente. Foram positivos no ELISA 34,4% e 18,1% das amostras do grupo S+ID utilizando as frações NL e Gal, respectivamente. As técnicas sorológicas utilizando variações antigênicas constituem ferramentas alternativas importantes de diagnósticos que podem ser aplicadas à strongiloidíase humana, sobretudo na população imunocomprometida.

Descritores: *Strongyloides stercoralis*; antígenos de helmintos; proteômica; testes imunológicos; ensaio de imunoabsorção enzimática; western blotting.

SUMMARY

Corral MA. *Immunoproteomics applied to the improvement of serologic diagnosis of human strongyloidiasis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Strongyloidiasis is a parasitic infection caused by nematode *Strongyloides stercoralis*. In immunocompetent patients, it is chronic and asymptomatic in the most of cases. However, in immunocompromised patients, it can take on severe forms such as hyperinfection and / or disseminated strongyloidiasis. Due to the parasitological diagnosis's low sensitivity, research involving the immunoassay has been carried out, primarily focused on changes in the heterologous antigenic fractions using *Strongyloides venezuelensis* as a source of antigen. The present work aimed to improve the serological diagnosis of human strongyloidiasis using immunoproteomic techniques. Feces and sera samples from immunocompetent patients were used and divided into three groups according to parasitological examination result (P: positive for *S. stercoralis*, OP: with other parasites, N: negative for any parasites or commensal). Samples from immunocompromised patients were divided into two groups according to the parasitological examination result (S+ID: positive for *S. stercoralis* and S-ID: negative for *S. stercoralis* or any parasite). Serum samples from the five groups of patients were submitted to serological tests by *S. venezuelensis* soluble (TS) and from membrane (TM) heterologous antigenic fractions by ELISA, DOT ELISA and Western blotting techniques. The ELISA test showed 95% sensitivity in both antigenic fractions and 91.8% and 93.8% specificity for TS and TM, respectively. This technique was able to detect anti-*Strongyloides* antibodies in 34.4% and 28.1% in S+ID group by using the TS and TM antigens, respectively. DOT ELISA was performed only with the TM fraction and showed 95% sensitivity and 85.7% specificity, detecting 28.1% positivity in S+ID group. The 40-35 KDa band was the only present in all P group individuals and the most frequent in S+ID patients (62.5% for TS and 53.1% for TM). Replicate gels were made, excised in the protein identification regions and submitted to protein identification by mass spectrometry. The most abundant proteins in TS and TM antigenic fractions were actin and galectin. TS antigen was purified on a galectin affinity column, due the immune modulation ability. The non-bound (NL) and galectin (Gal) fractions were used as antigens in the ELISA technique with 90% of sensitivity and 89.8 and 75% of specificity for NL and Gal, respectively. 34.4% and 18.1% of S+ID group were positive in the ELISA by NL and Gal fractions, respectively. Serological techniques using antigenic variations are an important alternative diagnostic tool and can be applied to human strongyloidiasis, especially in the immunocompromised population.

Descriptors: *Strongyloides stercoralis*; antigens, helminth; proteomics; Immunologic tests; enzyme-linked immunosorbent assay; western blotting.

INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase é uma infecção parasitária causada por nematódeos do gênero *Strongyloides*. Esses helmintos foram relatados pela primeira vez no final do século XIX. Parasitos pertencentes a este gênero podem parasitar aves, anfíbios, répteis e mamíferos, sendo que *Strongyloides fuelleborni* e *Strongyloides stercoralis* são as espécies que parasitam o homem. *S. fuelleborni* foi diagnosticado em indivíduos da Papua Nova Guiné e da África de forma esporádica, enquanto que *S. stercoralis* apresenta distribuição mundial (Grove, 1996; Viney; Lok, 2007; Beknazarova *et al.*, 2016).

S. stercoralis prevalece especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que 30 a 100 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (Olsen *et al.*, 2009; Beknazarova *et al.*, 2016; WHO, 2016), entretanto esses dados podem ser subestimados, podendo chegar a 370 milhões (Bissoffi *et al.*, 2013).

Os dados epidemiológicos na América Latina são controversos. A revisão sistemática de Buonfrate *et al.* (2015a) apontou prevalência variada nos diferentes países, sendo que Bolívia, Chile, Colômbia, Guiana, México e Nicarágua apresentaram prevalência menor que 5%, Brasil e Peru de 10 a 20% e Argentina, Equador e Venezuela maior que 20%. Por outro lado, Paula e Costa-Cruz (2011) em um trabalho de revisão da literatura estimaram a ocorrência média no Brasil em 5,5%.

Trata-se de uma parasitose crônica, frequentemente assintomática, que se segue à penetração ativa da larva filarioide (L3) pela pele (Figura 1). Após a passagem pelo pulmão e concomitante maturação, haverá deglutição e posterior transformação em fêmea parasita na mucosa do duodeno. Essa fêmea parasita

iniciará a postura dos ovos por partenogênese. Ainda no intestino as larvas rabditoides (L1) eclodirão dos respectivos ovos, podendo ser eliminadas com o material fecal ou se transformarem em larvas filarioides no próprio intestino, promovendo autoinfecção que poderá ser interna ou externa. As larvas rabditoides eliminadas com o material fecal se transformarão em larvas filarioides no ambiente podendo infectar um novo hospedeiro (ciclo direto) ou se transformarem em adultos de vida livre (ciclo indireto). Característica única e habitual no ciclo biológico de *S. stercoralis* é a ocorrência de autoinfecção interna ou externa promovida pela presença de hidroxiecdisona, um hormônio que desencadeia a ecdise. Isso explica a permanência do parasito em um determinado hospedeiro durante décadas e também a possibilidade de aumento da carga parasitária sob determinadas circunstâncias, possibilitando a ocorrência das formas graves dessa parasitose (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2012).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*. (1) L1 eliminadas pelas fezes; (2) Desenvolvimento de adultos de vida livre; (3) Ovos são produzidos por fêmeas de vida livre; (4) Desenvolvimento de larva rabditoide a partir de ovos embrionados; (5) Transformação L1 em L3; (6) Penetração da L3 na pele; (7) L3 é carregada pelo sistema circulatório e pulmões, ocorre a migração da larva para a faringe, as larvas deglutidas chegam ao intestino transformando-se em fêmeas partenogenéticas; (8) Fêmeas adultas no intestino; (9) Os ovos são depositados na mucosa intestinal e as larvas migram para luz intestinal.

Fonte: Adaptado de CDC, 2016. <http://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>

Nos indivíduos imunodeprimidos e nos que fazem uso de corticosteroides (um dos metabólitos forma produtos semelhantes ao hormônio de ecdise) a doença pode assumir extrema gravidade, podendo evoluir para formas graves como a hiperinfecção ou doença disseminada. A hiperinfecção é caracterizada pela presença maciça de larvas nos sítios habituais de passagem das mesmas durante o ciclo biológico e a estrongiloidíase disseminada ocorre quando há presença de larvas em órgãos que não participam do ciclo biológico do parasito (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996; Concha *et al.*, 2005). Essa última condição resulta em elevada letalidade.

Em relação aos pacientes imunodeprimidos, especial atenção deve ser dada aos candidatos a transplantes. Além da imunossupressão induzida após o transplante, que os coloca sob risco de desenvolverem formas graves da estrongiloidíase, há que se considerar que doadores de órgãos provenientes de áreas endêmicas poderão transmitir a infecção aos receptores (Marcos *et al.*, 2011; Abanyie *et al.*, 2015). Casos de hiperinfecção ou estrongiloidíase disseminada foram relatados após transplantes de órgãos sólidos, como renal (Said *et al.*, 2007; Valar *et al.*, 2007; Agarwala *et al.*, 2014; Khuroo *et al.*, 2014), hepático (Vilela *et al.*, 2009) e cardíaco (Schaeffer *et al.*, 2004; Masry; O'Donnell, 2005; Sanches *et al.*, 2015). Também há relatos de casos, como os supracitados, após transplante de medula óssea (Orlent *et al.*, 2003; Barsoum, 2004; Dulley *et al.*, 2009; Izquierdo *et al.*, 2013; Jarque *et al.*, 2016).

A maioria dos trabalhos envolvendo imunossupressão e estrongiloidíase consistem em relatos de casos após o desenvolvimento de formas graves da parasitose. Poucos são os trabalhos que abordam o diagnóstico da

estrongiloidíase em pacientes com algum tipo de imunocomprometimento (Paula *et al.*, 2000; 2013; 2016; Silva *et al.*, 2014; Gottardi *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2016; Inês *et al.*, 2017).

O diagnóstico definitivo da estrongiloidíase ocorre pela visualização de larvas, principalmente nas fezes. As técnicas parasitológicas possuem baixa sensibilidade, uma vez que a liberação de larvas nas fezes é irregular e intermitente na maioria dos casos (Costa-Cruz *et al.*, 2003). As técnicas de Baermann (1917) - Moraes (1948) e Rugai *et al.* (1954) são as mais adequadas para pesquisa de larvas e baseiam-se no termohidrotropismo larvário. Entretanto, são necessárias coletas de cinco a oito amostras em dias alternados para os resultados de sensibilidade variarem de 60 a 100% (Uparanukraw *et al.*, 1999). A cultura em placa de ágar (Arakaki *et al.*, 1988; Koga *et al.*, 1991) apresenta maior sensibilidade dentre os métodos parasitológicos, mas exige um tempo maior na obtenção dos resultados (Kobayashi *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 2007; Inês *et al.*, 2011; Paula *et al.*, 2013).

As técnicas sorológicas apresentam sensibilidade próxima a 100%, sendo úteis no diagnóstico de hospedeiros com formas assintomáticas, no esclarecimento do diagnóstico clínico de pacientes com eosinofilia e em inquéritos soroepidemiológicos (Costa-Cruz *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003, Requena-Mendez *et al.*, 2013; Levanhagen; Costa-Cruz, 2014; Buonfrate *et al.*, 2015b; Corral *et al.*, 2015a).

Devido às limitações com a manutenção de cepas para obtenção dos antígenos de *S. stercoralis*, a utilização de outras espécies de *Strongyloides*, como *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis* tem sido relatada. Nesse

particular, a utilização de frações antigênicas de *S. venezuelensis* destaca-se por apresentar resultados promissores e com valores de sensibilidade e especificidade próximos àqueles obtidos a partir da utilização do antígeno homólogo (Costa-Cruz *et al.*, 1997; Eamudomkarn *et al.*, 2015).

O estágio evolutivo de larvas filarioides é o mais utilizado no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana, seja pela facilidade de obtenção de frações antigênicas desse estágio, como também pela obtenção de bons valores de parâmetros de diagnóstico. Por outro lado, frações antigênicas derivadas dos estágios evolutivos de ovos e/ou fêmeas parasitas foram descritas por Northern e Grove (1990), Gonçalves *et al.* (2012a, 2012b, 2016), Goulart de Carvalho *et al.* (2015) e Corral *et al.* (2015b), mas apresentaram desempenho inferior em termos de sensibilidade e especificidade, quando comparados aos antígenos de larvas filarioides, porém constituem forma alternativa na obtenção de antígenos podendo ser utilizados em áreas com poucos recursos para manutenção da cepa do parasito.

Estudos recentes vêm propondo variações na forma de obtenção de antígenos. Dentre estes pode-se destacar o tratamento com detergentes (Feliciano *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014), a purificação com o auxílio de colunas (Gonzaga *et al.*, 2011; 2013; 2018; Inês *et al.*, 2013; 2017), a utilização de frações de membrana (Corral, *et al.*, 2015a; 2017; Paula *et al.*, 2016) e a obtenção dos antígenos de excreção e secreção (Cunha *et al.*, 2017). Teste rápido de diagnóstico para estrogiloidíase (Bon *et al.*, 2010) e técnicas baseadas na produção de antígenos recombinantes (Ravi *et al.*, 2002; Krolewski *et al.*, 2010; Arifin *et al.*, 2018), na metodologia de *Phage-display* (Feliciano *et*

al., 2014) e na utilização de peptídeos sintéticos (Feliciano *et al.*, 2016) também têm sido relatadas para o aprimoramento do diagnóstico sorológico dessa helmintíase, porém com menor frequência.

As técnicas sorológicas visam com maior frequência a pesquisa de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA no soro. Há relatos como o de Mota-Ferreira *et al.* (2009), de Eamudomkarn *et al.* (2018) e de Bosqui *et al.* (2015) que buscaram detectar IgG e IgA no leite materno, urina e na saliva respectivamente; e Bosqui *et al.* (2018) ainda detectaram imunocomplexos no mesmo material biológico. No entanto ainda há necessidade de padronização das técnicas realizadas com as amostras biológicas supracitadas e, consequentemente, mais estudos similares devem ser realizados.

O desenvolvimento e aprimoramento de métodos de diagnóstico moleculares também vêm sendo relatado na literatura. Recentemente Buonfrate *et al.* (2018) realizaram uma revisão sistemática sobre o tema e concluíram que tanto a PCR convencional como a PCR em tempo real podem ser utilizados como testes confirmatórios diante dos valores apreciáveis de especificidade (95,3% e 95,4%, respectivamente), porém com ressalvas para a triagem de pacientes dada a baixa sensibilidade (61,9% e 56,5%, respectivamente). Tais resultados reforçam os investimentos no desenvolvimento das técnicas sorológicas, sobretudo os estudos proteômicos para reconhecimento da estrutura proteica dos antígenos.

Proteoma pode ser descrito como o conjunto de proteínas expressas a partir de um genoma celular ou de organismos frente a estímulos internos e/ou externos (Padrón; Domont, 2014). As técnicas analíticas que identificam os

proteomas empregam análise de expressão diferencial temporal e espacial de proteínas, caracterização de modificações pós-traducionais e a identificação de interações proteicas (Wilkins *et al.*, 1996; Anderson; Anderson, 1998; Ahrens *et al.*, 2010; Valledor; Jorin, 2011).

As contribuições da proteômica no estudo de parasitoses são amplas e estão relacionadas principalmente com biologia parasitária e a identificação de alvos para o aprimoramento do diagnóstico, sobretudo com o auxílio da imunoproteômica, que visa a identificação de proteínas imunogênicas principalmente por *Western-blotting*. Estudos proteômicos e imunoproteômicos de diversos parasitos que acometem o homem podem ser encontrados na literatura como com *Leishmania* spp (Matrangola *et al.*, 2013; Braga *et al.*, 2014), *Angiostrongylus* spp (Rebello *et al.*, 2011), *Schistosoma mansoni* (Castro-Borges *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2015) e *Taenia solium* (Victor *et al.*, 2012; Diaz-Masmela *et al.*, 2013).

Os estudos proteômicos envolvendo parasitos do gênero *Strongyloides* são escassos e descrevem de maneira geral as proteínas encontradas em extratos somáticos ou de secreção e excreção de diferentes formas evolutivas do parasito (Northern; Grove, 1990; Marcilla *et al.*, 2010; Soblik *et al.*, 2011). Há ainda apenas três relatos na literatura sobre as técnicas imunoproteômicas (Rodpai *et al.*, 2016, 2017; Corral *et al.*, 2017). Nestes relatos foram utilizadas as técnicas de WB de uma (1D) e duas (2D) dimensões associadas às técnicas de espectrometria de massas para a identificação de proteínas imunogênicas.

Contudo, ainda não há nenhum trabalho envolvendo a aplicação das técnicas imunoproteômicas ao aprimoramento do diagnóstico imunológico da

estrongiloidíase humana utilizando proteínas identificadas nas formas evolutivas de *S. venezuelensis*. Diante desse panorama em que as técnicas sorológicas se apresentam como promissoras quando comparadas às técnicas moleculares, a utilização de antígenos purificados a partir da fração heteróloga frente a amostras de soro de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos se torna extremamente desejável e importante para a estrongiloidíase, sobretudo no contexto epidemiológico no qual a parasitose se encontra no país.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Aprimorar o imunodiagnóstico da strongiloidíase humana a partir da imunoproteômica de *Strongyloides venezuelensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar as frações solúvel e de membrana de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, por eletroforese em gel de poliacrilamida uni e bidimensional;
- Padronizar e aplicar a técnica de DOT ELISA para o diagnóstico sorológico da strongiloidíase humana;
- Realizar WB 1D e 2D para posterior detecção de proteínas imunodominantes de *S. venezuelensis* reconhecidas por anticorpos de indivíduos infectados por *S. stercoralis* imunocompetentes e imunocomprometidos;
- Identificação de proteínas selecionadas por espectrometria de massa;
- Purificação do antígeno bruto e aplicação às técnicas de imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

MÉTODOS

Os métodos adotados para condução deste trabalho estão resumidos no fluxograma abaixo (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma dos experimentos realizados na condução do estudo a partir de amostras biológicas de pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos.

3.1 Caracterização do antígeno heterólogo de *Strongyloides venezuelensis*

3.1.1 Aspectos éticos na experimentação animal

Os projetos experimentais de pesquisa cumprem a Lei 11.794/2008 e os princípios éticos na Experimentação Animal (SBCAL) além de outras instruções que regulamentam pesquisas com animais. Os trabalhos foram iniciados após aprovação do projeto de pesquisa número CEP-IMT 002/10, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (IMT-USP), São Paulo, Brasil.

3.1.2 Manutenção da cepa de *S. venezuelensis*

Para manutenção do ciclo do parasito, *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, mantidos no Biotério IMT-USP foram infectados experimentalmente quinzenalmente, via subcutânea, com larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

3.1.3 Obtenção dos parasitos

As larvas filarioides foram obtidas a partir de cultura das fezes de ratos infectados. Aproximadamente 10 gramas de fezes foram diluídas em água e acrescidas de carvão animal, tendo a cultura ficado em estufa (28°C) por 48 horas. As larvas filarioides foram colhidas e concentradas utilizando a técnica de Rugai *et al.* (1954). Em seguida, as larvas recolhidas foram contadas sob microscopia óptica, lavadas em solução salina, e mantidas a -20°C até o momento do uso.

3.1.4 Obtenção das frações antigênicas

Aproximadamente 200.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis* foram ressuspensas em tampão de homogeneização 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, suplementado com coquetel de inibidores de protease. Em seguida a solução de larvas passou por sonicação e posterior centrifugação a 12400g/4°C por 30 minutos. O sobrenadante deu origem a fração solúvel (TS). Já o *pellet* foi ressuspenso em tampão de rehidratação (Ureia 7M, Tiourea 2M e CHAPS 2%), homogeneizado por 30 min/4°C e centrifugado a 12400g/4°C por 30 minutos. O sobrenadante deu origem a fração de membrana (TM).

3.1.5 Caracterização das frações antigênicas

Uma alíquota das frações antigênicas foi destinada a avaliação da concentração proteica utilizando o kit *DC Protein Assay* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) baseada na técnica desenvolvida por Lowry *et al.* (1951). Paralelamente, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 1D em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para as frações antigênicas solúveis e de membrana. O 2D também foi realizado para as frações TS e TM, conforme descrito por Castro-Borges *et al.* (2007).

Para determinar o perfil de bandas, aproximadamente 20µg/mL por cm de gel das frações antigênicas foram submetidos a eletroforese 1D, de acordo com Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida de 12% foi preparado em suporte vertical para mini-gel. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (125mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%, 50mM DTT, Azul de bromofenol 0,01%) e aquecidas a 100°C em banho-maria por cinco minutos. Após a adição do tampão de corrida (25mM Tris, 192mM Glicina, 3,5mM SDS) foi realizada a

eletroforese a 20mA/gel por aproximadamente duas horas. Foi utilizado padrão de massa molecular (10 a 260kDa - BioRad) para determinação das bandas proteicas relativas.

Para a obtenção de geis 2D, cerca de 100 µg de cada fração antigênica foram diluídas 1:4 em tampão de hidratação (7M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, 65 mM DTT, 0,8% Resolytes e 0,001% azul de bromofenol) e, em seguida, submetidas à incorporação no gel utilizado para a focalização isoeletrica. O processo de isoeletrofocalização ocorreu à temperatura de 30°C a 50 mA/ gel: 1 – Reidratação durante 12 horas; 2 – 500 V durante 30 min; 3 – 1000 V durante 30 min; 4 – 8000 V durante 4 horas.

Após a separação das proteínas de acordo com o ponto isoeletrico na primeira dimensão, os respectivos géis foram submetidos ao processo de redução e alquilação. A reação de redução ocorreu na presença de 3mL de DTT a 1% durante 15 minutos, seguida do processo de alquilação na presença de 3mL de iodoacetamida a 4% por 15 minutos adicionais. Após este processo, os géis de primeira dimensão foram montados sobre gel de SDS-PAGE 12% e submetidos à eletroforese a 20mA/gel por aproximadamente duas horas para a separação de acordo com a massa molecular. Após a fixação dos géis em 40% metanol/ 10% ácido acético por 30 minutos, o gel foi corado com *Coomassie blue* 0,5% (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) e digitalizado para documentação. Massas moleculares das frações proteicas foram determinadas por regressão linear, de acordo com o padrão de massa molecular referência.

3.2 Imunodiagnóstico

3.2.1 Aspectos éticos em pesquisa envolvendo seres humanos

De acordo com as normas que regem as pesquisas que envolvam seres humanos, foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) que obedece às recomendações da Resolução número 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, posteriormente, à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado sob número 1.684.722 (Apêndice B).

3.2.2 Casuística

3.2.2.1 População imunocompetente

Foram utilizadas 69 amostras de soro armazenadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), de Imunopatologia da Esquistossomose e outras parasitoses, provenientes de outros trabalhos realizados pelo grupo (Corral *et al.*, 2015a, 2015b; Corral *et al.*, 2017) aprovados pela CAPPesq sob número 0123/12 e 266.046 (Apêndices C e D). Essas amostras foram divididas em três grupos (S, OP e N), tendo como base os resultados parasitológicos das amostras de fezes.

No momento de coleta foi solicitado uma amostra de sangue e de fezes de indivíduos que tinham acompanhamento ambulatorial no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo e voluntários do IMT-USP. O critério de inclusão à pesquisa constituiu-se do fornecimento de amostras de fezes e sangue e o de exclusão a idade inferior a 10 anos.

Os indivíduos dos grupos positivo (P) e outras parasitoses (OP) foram recrutados a partir do diagnóstico parasitológico conduzido na Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com métodos de rotina (Lutz, Rugai, Faust e coloração pelo Tricrômio) em amostras de fezes. O recrutamento se deu por contato telefônico, pelo qual se solicitou nova amostra de fezes. Na consulta médica, o indivíduo foi informado sobre a pesquisa e convidado a participar do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada a coleta de uma amostra de sangue, por punção venosa, antes do tratamento.

O grupo negativo (N) foi formado por voluntários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Foram solicitadas amostras de fezes e sangue, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. De acordo com o resultado coproparasitológico os indivíduos foram direcionados aos grupos P, OP ou N.

As amostras de fezes foram processadas imediatamente após a coleta pelos métodos de sedimentação, cultura em placa de ágar e Rugai. Para técnica de sedimentação espontânea (Lutz, 1919), aproximadamente 5g de fezes foram diluídos em água filtrada, sendo posteriormente filtrados em gaze, permanecendo em repouso por aproximadamente duas horas. O sedimento

formado, acrescido de Lugol, foi analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x. Para cultura em placa de ágar (Koga *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 2013), aproximadamente 2g de fezes foram adicionadas a uma placa de Petri contendo ágar motilidade (ágar, peptona, extrato de carne). A placa foi vedada e deixada a 28°C por dois dias. Após este período, a placa foi embebida em álcool 70% por 10 minutos. O material foi coletado, centrifugado, e analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x. O restante do material fecal permaneceu no frasco coletor para análise pela técnica de Rugai *et al.* (1954). O frasco foi recoberto com gaze e vertido em um cálice contendo água aquecida a 40°C por duas horas. O material sedimentado foi coletado, e analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para a separação do soro permanecendo estocado a -20°C no laboratório.

Os pacientes imunocompetentes foram divididos de acordo com os resultados parasitológicos das amostras de fezes, a saber:

- **Grupo P:** 20 pacientes imunocompetentes com exame parasitológico positivo para *S. stercoralis*.
- **Grupo OP:** 22 pacientes imunocompetentes com exame parasitológico positivo para outros parasitos (*Schistosoma mansoni* (n=7), Ancilostomídeos (n=6), *Hymenolepis nana* (n=1), *Ascaris lumbricoides* (n=2), *Giardia duodenalis* (n=3), *Blastocystis* spp (n=3).

- **Grupo N:** 27 pacientes imunocompetentes com exame parasitológico negativo para *S. stercoralis* e demais parasitoses intestinais

3.2.2.2 *Pool* de soros

Para realização do WB 2D foram realizados *pool* de soros uma vez que para sua realização há a necessidade da utilização de grande volume de amostra.

3.2.2.3 População imunocomprometida

Foram utilizadas 59 amostras de soro armazenadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), de Imunopatologia da Esquistossomose e outras parasitoses, provenientes de outros trabalhos realizados pelo grupo (Gottardi *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2016) previamente aprovados pela CAPPesq sob número 0123/10. O recrutamento dos pacientes imunocomprometidos também foi realizado por contato telefônico a partir da lista de agendamento semanal dos diversos ambulatórios (Transplante de Fígado, Transplante de Rim, Transplante de Medula Óssea e HTLV). Por meio deste foi solicitado nova amostra de fezes. Na consulta médica, o indivíduo foi informado sobre a pesquisa e convidado a participar do estudo. Os pacientes portadores do vírus HIV foram recrutados na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde eram pedidas amostras de sangue e fezes. Os pacientes com câncer foram recrutados como os pacientes dos grupos (P e OP). Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada a coleta de uma amostra de sangue, por punção venosa, antes do tratamento, se necessário.

As amostras dos pacientes imunodeprimidos foram divididas em dois grupos (S+ID e S-ID) baseando-se nos resultados parasitológicos das amostras de fezes, a saber:

- **Grupo S+ID:** 32 pacientes imunodeprimidos com exame parasitológico positivo (seguindo os critérios descritos no item 3.2.2.1) para *S. stercoralis*: Candidato a transplante de órgão (n=15), HIV + (n=3), HTLV + (n=3), pós-transplante de rim (n=5), com câncer (n=6).
- **Grupo S-ID:** 27 pacientes imunodeprimidos com exame parasitológico negativo (seguindo os critérios descritos no item 3.2.2.1) para *S. stercoralis* e demais parasitoses intestinais: Candidato a transplante de órgão (n=22), HIV + (n=3), HTLV + (n=2).

3.2.3 ELISA

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com Corral *et al.* (2015a), sendo que as placas de poliestireno foram sensibilizadas *overnight* com 10µg/ml das diferentes frações antigênicas, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. Após lavagem com PBS-T (tampão fosfato acrescido de Tween 20), foram adicionados os soros padrões negativos e positivos, bem como soros-testes diluídos em PBS-TM (PBS-T acrescido de leite em pó). Após 45 minutos a 37°C, nova lavagem com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano fração Fc marcado com peroxidase em PBS-TM. Após 45 minutos a

37°C, foi adicionado 100µL de reagente cromogênico TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidino – Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) na ausência da luz por 6 minutos. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. Os valores de absorbância foram determinados em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450nm.

3.2.4 DOT ELISA

O DOT ELISA foi realizado de acordo com Pinto *et al.* (1995) com algumas modificações. Previamente a aplicação de todas as amostras de soro foi realizado uma padronização com diferentes diluições do soro e do conjugado. Também foram testados dois tipos de revelação: utilizando DAB e substrato quimioluminescente.

Após a padronização estabeleceu-se que as membranas de 1 cm² de nitrocelulose fossem sensibilizadas com 1,5µg de cada uma das frações antigênicas por 1 hora, seguido de bloqueio overnight com PBS-TM 5% em agitação e refrigeradas. Após esse período as amostras de soro foram diluídas 1:5.000 e o conjugado 1:50.000 em PBS-TM por duas horas cada sob agitação. Entre as etapas, 5 lavagens de 1 minuto cada com PBS-T foram realizadas sob agitação. Para revelação o substrato utilizado foi Kit Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) por quimioluminescência com auxílio do scanner Luminescent image analyser (Fujifilm, Minato, Tóquio, JP) e do programa Image Quant LAS 400 versão 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA).

3.2.5 Western-blotting

Para determinar o perfil de bandas proteicas reconhecidas pelos soros positivos para *S. stercoralis*, após a SDS-PAGE, foram realizados o WB de uma dimensão (1D) e de duas dimensões (2D) de acordo com Corral *et al.* (2017). O WB 1D foi realizado primeiramente com todos indivíduos para identificação das bandas imunorreativas. Após este primeiro ensaio, procedeu-se com a realização da técnica utilizando os *pools* de soros.

Membranas de PVDF (20 μ m) foram utilizadas para a transferência em sistema Mini Trans-blot. O sistema de eletrotransferência foi executado com a utilização de esponja, papéis filtro, gel e membrana formando um sanduíche, umedecidos em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, etanol 20%, SDS 0,69mM) a 4°C e 200mA.

Para WB 1D as membranas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm, e para WB 2D as membranas foram utilizadas inteiras, as duas membranas foram armazenadas até o momento do uso.

Para realização das técnicas de WB1D e 2D, as membranas foram colocadas para reagir com o anticorpo primário (soros testes) diluído 1:100 em tampão de diluição (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, 0,1% Tween 20 e leite desnatado em pó 5%) por um período de aproximadamente 18 horas a 4°C, após bloqueio em tampão (Tris-HCl 50mM; 0,7% Tween 20 e Leite em pó 5%) por 1h. O anticorpo secundário (anti-IgG humana fração Fc conjugado com peroxidase) foi diluído 1:1000 no tampão de diluição do anticorpo por 1h30. A revelação foi realizada com DAB acrescido de metal comercial (Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na ausência de luz.

A detecção de componentes antigênicos foi realizada com auxílio do

scanner Luminescent image analyser (Fujifilm, Minato, Tóquio, JP) e do programa Image Quant LAS 400 versão 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA).

3.3 Imunoproteômica

3.3.1 Identificação de proteínas

Para identificação das proteínas, as membranas de *Wester-blotting* reveladas foram sobrepostas aos géis e os *spots* encontrados foram excisados dos géis 1D e 2D de acordo com Castro-Borges *et al.* (2007).

3.3.2 Digestão tríptica e identificação de proteínas por espectrometria de massa

Os fragmentos de gel foram mantidos em solução descorante até o descolorimento por completo. Após a lavagem em água mili-Q, as bandas foram digeridas em solução de tripsina em bicarbonato de amônio (40mM) durante 20 minutos, seguido por incubação durante 12h a 37°C em bicarbonato de amônio (20mM). Após a purificação dos peptídeos procedeu-se a espectrometria de massa do tipo Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific®) em espectrômetro de massa modelo 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems).

Após a obtenção dos espectros de massas, o conjunto de dados foi submetido à busca em banco de dados utilizando o software Proteome Discoverer (versão 1.4, Thermo Scientific®). Para isso, utilizou-se o *workflow* com sistema de busca via SequestHT com event detector e precursor ions area detector, para quantificação por label-free. Os parâmetros de busca incluíram: (i) enzima: tripsina/P; (ii) número máximo de sítio de clivagem perdidos = 2; (iii)

carbamidometilação (C), como modificação estática; (iv) oxidação de metionina e acetilação N-terminal, como modificações dinâmicas; (v) tolerância de massa de 10 ppm para íons parentais e de 0,1 Da para os fragmentos. Como banco de dados para a realização da busca utilizou-se o banco de *Strongyloides* disponível no servidor Uniprot (www.uniprot.org), contendo 12.544 sequencias. Após a busca, foram consideradas como identificadas apenas as proteínas que apresentaram peptídeos com confiabilidade de no mínimo 5% (taxa de false discovery rate) e com o mínimo de dois peptídeo únicos.

3.4 Utilização da galectina como fonte antigênica

3.4.1 Purificação da fração antigênica em coluna de galectina

Uma alíquota da fração antigênica TS foi submetida à cromatografia em coluna α -lactose-agarose (Sigma-aldrish, St. Louis, Missouri, EUA). A coluna foi lavada três vezes com PBST e equilibrada com solução de extração de proteínas antes de receber o antígeno bruto, que foi homogeneizado *overnight* a 4°C. Após esse período, a coluna foi centrifugada e o sobrenadante deu origem a fração não ligada (NL). A resina foi lavada e eluída com solução de lactose (Solução de extração de proteínas acrescido de 300mM de NaCl e 200mM de lactose). O sobrenadante originou a fração galectina (Gal).

3.4.2 Caracterização das frações purificadas

Após a purificação as frações NL e Gal foram analisadas conforme o item 3.1.5 porém coradas com nitrato de prata. O gel de 2D não foi realizado, dado os baixos volume e concentração das proteínas recuperadas.

O WB também foi realizado para confirmação da ligação das proteínas à coluna. A técnica foi realizada conforme o item 3.2.5 com algumas modificações. As membranas de PVDF (20µm) contendo a fração galectina receberam tampão de bloqueio (Tris-HCl 50mM; 0,7% Tween 20 e Leite em pó 5%) por 1h, seguido do anticorpo específico anti-Galectina, gentilmente cedido pelo Dr. Roger Chammas e Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva, produzido em rato diluído 1:200 em tampão de diluição do anticorpo (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, 0,1% Tween 20 e leite desnatado em pó 5%) por um período de aproximadamente 18 horas a 4°C. A seguir, o anticorpo secundário anti-rato biotinilado (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi diluído 1:500 em tampão de diluição do anticorpo por 1h30 e finalmente a estreptavidina foi diluída 1:125 em tampão de diluição do anticorpo por 1h30. O sistema foi revelado utilizando o Kit *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) por quimioluminescência com auxílio do scanner Luminescent image analyser (Fujifilm, Minato, Tóquio, JP) e do programa Image Quant LAS 400 versão 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA).

3.4.3 ELISA utilizando as frações purificadas

O ELISA foi realizado como descrito no item 3.2.3 com as frações antigênicas NL e Gal utilizando as amostras de soro de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos.

3.5 Normas de Biossegurança

Os procedimentos de coleta, manipulação de materiais biológicos e reagentes, além da utilização de equipamentos, estiveram em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo *et al.* (2005).

3.6 Análise estatística

Os valores dos parâmetros de diagnóstico (*Cut off*, sensibilidade, especificidade) foram obtidos a partir das amostras controle (grupo N + grupo OP) em relação aos positivos para *S. stercoralis* (Grupo P) com a construção da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (Greiner *et al.*, 1995). As análises estatísticas foram realizadas utilizando programa GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software Inc. San Diego, USA). O intervalo de confiança foi $p < 0,05$.

Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off*, sendo consideradas positivas as amostras com $IE > 1,0$.

A análise dos antígenos no Western-blotting nos diferentes grupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis utilizando comparações não paramétricas de Dunn (Neter *et al.*, 1996; Kirkwood; Sterne, 2006).

RESULTADOS

4.1 Caracterização do antígeno heterólogo de *Strongyloides venezuelensis*

Após a obtenção das frações antigênicas as concentrações proteicas foram 2,2mg/mL e 3,0mg/mL para as frações TS e TM respectivamente. A análise por SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes 1D e 2D foi realizada para observar o perfil das proteínas para cada fração antigênica.

No gel 1D observou-se diversas bandas proteicas com massas moleculares variando de 180-12kDa (Figura 3). No gel 2D, o perfil de migração eletroforética dos *spots* é semelhante e as proteínas isoeletrofocalizaram entre a faixa de pH 3 a 7 (Figura 4).

Figura 3 – SDS-PAGE 1D 12% corado por *Coomassie Blue* indicando perfil proteico das frações solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

Figura 4 – SDS-PAGE 2D 12% corados por Coomassie Blue indicando perfil proteico das frações solúvel (TS) (A) e de membrana (TM) (B) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

4.2 Imunodiagnóstico

4.2.1 Validação das técnicas imunoenzimáticas – ELISA e DOT ELISA em amostras de pacientes imunocompetentes

4.2.1.1 ELISA

A análise da curva ROC utilizando soros de pacientes imunocompetentes está demonstrada na figura 5. Os antígenos TS e TM apresentaram sensibilidade de 95% e especificidade de 91,8% e 93,8%, respectivamente. O *cut-off* das reações foram 0,154 para fração TS e 0,149 para TM (Figura 6).

Figura 5 - Curvas ROC, segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações solúveis TS (A) e de membrana TM (B) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos (n=20) em relação aos indivíduos negativos (n=27) e com outras parasitoses (n=22).

Figura 6 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) por ELISA utilizando as frações antigênicas solúvel - TS (A) e de membrana - TM (B) de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo.

4.2.1.2 DOT ELISA

Alguns testes com variação na diluição do soro e do anticorpo secundário, bem como nos métodos de revelação foram testados para padronização do DOT ELISA. A figura 7 ilustra as membranas com diferentes diluições do soro e conjugado reveladas com DAB, utilizando o antígeno TM. Utilizando o antígeno TS obtivemos 100% de sensibilidade, porém todos os indivíduos saudáveis e com outras parasitoses testados apresentaram reatividade inespecífica ou cruzada.

Soro	Conjugado	Grupo P	Grupo OP	Grupo N
1:100	1:3000
1:200	1:3000
1:300	1:3000
1:1000	1:5000
1:2000	1:10000
1:2000	1:20000

Figura 7 – DOT ELISA revelado utilizando DAB como substrato em diferentes diluições do soro e do conjugado em amostras de soro de indivíduos com *estrongiloidíase* (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) utilizando a fração antigênica de membrana - TM de *S. venezuelensis*.

Diante de resultados de DOT ELISA divergentes do diagnóstico parasitológico na fração TM e da não diferenciação entre as amostras dos indivíduos dos grupos P, OP e N na fração TS utilizando o DAB como substrato, padronizou-se a reação com substrato quimioluminescente. Quando os soros foram diluídos 1:5000 e o conjugado 1:50000 obteve-se 95% de sensibilidade e 85,7% de especificidade. Uma única amostra negativa foi reativa e em 6 com outros parasitos houve reatividade cruzada utilizando o antígeno TM (Figura 8). A utilização do antígeno TS continuou produzindo resultados que não diferenciaram as amostras dos grupos P, OP e N.

Figura 8 – DOT ELISA revelado com substrato quimioluminescente nas amostras de soro diluídas 1:5000 e conjugado 1:50000 utilizando a fração antigênica de membrana - TM de *S. venezuelensis*. 1, 2 e 3 pacientes positivos para *S. stercoralis* (grupo P); 4: paciente com Ancilostomídeo (grupo OP); 5: paciente com *A. lumbricoides* (grupo OP); 6 negativo (grupo N).

4.2.1.3 Correlação entre ELISA e DOT ELISA

A positividade das amostras de soro dos pacientes dos grupos P, OP e N frente ao antígeno TM no ELISA e no DOT ELISA estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Reatividade das amostras de soros dos pacientes imunocompetentes em relação as técnicas ELISA e DOT ELISA utilizando fração antigênica de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

	ELISA	DOT ELISA
<i>S. stercoralis</i>	19/20	19/20
Ancilostomídeos	2/6	2/6
<i>A. lumbricoides</i>	-	2/2
<i>H. nana</i>	-	-
<i>S. mansoni</i>	1/7	1/7
<i>Blastocystis</i> spp	-	1/3
<i>G. intestinalis</i>	-	-
Negativos	0/27	1/27

4.2.2 Aplicação das técnicas imunoenzimáticas – ELISA e DOT ELISA em amostras de pacientes imunodeprimidos

4.2.2.1 ELISA

Ao realizar o ELISA com os pacientes imunodeprimidos com eliminação ativa de larvas de *S. stercoralis* (S+ID) (Figura 9A) 34,4% e 28,1% das amostras foram positivas nos antígenos TS e TM, respectivamente. No grupo imunodeprimidos negativo para *S. stercoralis* (S-ID) não houve reatividade em nenhuma fração antigênica utilizada (Figura 9B).

Figura 9 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID, n=32, (A)) e negativos (S-ID, n=27, (B)) para *S. stercoralis* utilizando as frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo.

4.2.2.2 DOT ELISA dos pacientes imunodeprimidos

O DOT ELISA foi realizado utilizando somente a fração antigênica TM. O grupo S+ID apresentou 28,1% (9/32) de positividade. O grupo S-ID apresentou positividade em 5 amostras (18,5%) (Figura 10).

Figura 10 – DOT ELISA utilizando a fração antigênica TM em pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID) e negativos (S-ID) para *S. stercoralis* revelado com quimioluminescência. 1: paciente candidato a transplante renal positivo para *S. stercoralis*; 2: paciente portador do vírus HTLV positivo para *S. stercoralis*; 3: paciente com câncer positivo para *S. stercoralis*; 4: paciente candidato a transplante de medula óssea negativo para *S. stercoralis*; 5: paciente portador do vírus HIV negativo para *S. stercoralis*; 6: paciente candidato a transplante de fígado negativo para *S. stercoralis*.

4.2.2.3 Correlação entre ELISA e DOT ELISA

A tabela 2 indica a positividade das amostras de soro dos pacientes dos grupos S+ID e S-ID frente exclusivamente a fração antigênica TM no ELISA e no DOT ELISA.

Tabela 2 – Reatividade das amostras de soros dos pacientes imunodeprimidos em relação as técnicas ELISA e DOT ELISA utilizando fração antigênica de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

	S+ID	S-ID
	n (%)	n (%)
ELISA (+) DOT (+)	8 (25)	0 (0)
ELISA (+) DOT (-)	1 (3,1)	0 (0)
ELISA (-) DOT (+)	1 (3,1)	5 (18,5)
ELISA (-) DOT (-)	22 (68,8)	22 (81,5)
Total	32 (100)	27 (100)

Legenda: (S+ID): pacientes imunodeprimidos positivos para *S. stercoralis*; (S-ID): pacientes imunodeprimidos negativos para *S. stercoralis*; (+) resultado do exame sorológico reagente; (-) resultado do exame sorológico não reagente.

4.2.3 Western-blotting

Para avaliação do perfil de reconhecimentos de bandas imunorreativas, a técnica de WB 1D foi realizada com os soros dos pacientes imunocompetentes. A frequência de reatividade nas frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* encontra-se na tabela 3.

Pode-se observar o reconhecimento de diversas bandas imunogênicas, variando principalmente de 140 a 15kDa (Figura 11). A banda de maior frequência identificada por indivíduos positivos para *S. stercoralis* foi a de 40-30kDa em ambas frações antigênicas. A reatividade dessas bandas nos grupos P, OP e N está apresentada na tabela 4.

Há diferença estatística ($p < 0,0001$) entre o reconhecimento de bandas de pacientes do grupo P quando comparado com os dos grupos OP e N.

Figura 11 – *Western-blotting* 1D utilizando as frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. 1: amostra positiva para *S. stercoralis*; 2: amostra com *S. mansoni*; 3: amostra negativa para quaisquer parasitos. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons.

Tabela 3 – Frequência de reatividade de amostras de soro no *Western-blotting* utilizando as Frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

Bandas Imunorreativas	TS (%)		TM (%)	
	P	OP/N	P	OP/N
110-100	100	-	95,0	4,1
53-49	95,0	4,1	65,0	2,0
40-35	100	6,1	100	8,2
29-28	95,0	4,1	80,0	2,0
23-20	20,0	2,0	60,0	2,0
15	20,0	4,1	65,0	8,2
12	-		60,0	-

Legenda: P: Indivíduos positivos para *S. stercoralis*; OP: Indivíduos com outras parasitoses intestinais; N: Voluntários sadios negativos para quaisquer parasitoses intestinais.

Tabela 4 – Reatividade (pacientes do grupo P, n=20), reatividade cruzada (pacientes do grupo OP, n=22) ou reatividade inespecífica (pacientes do grupo N, n=27) das amostras de soros em relação as bandas imunogênicas das frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, observadas no *Western-blotting*.

Tipo de amostra de soro	110-100 KDa		53-49 KDa		40-35 KDa		29-28 KDa		23-20 KDa		15 KDa		12 KDa	
	TS	TM	TS	TM	TS	TM	TS	TM	TS	TM	TS	TM	TS	TM
<i>S. stercoralis</i>	20/20	19/20	19/20	13/20	20/20	20/20	19/20	16/20	4/20	12/20	4/20	13/20	-	12/20
Ancilostomídeos	-	1/6	-	-	-	1/6	-	-	-	1/6	-	1/6	-	-
<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mansoni</i>	-	1/7	1/7	-	-	1/7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Blastocystis</i> spp	-	-	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. intestinalis</i>	-	-	-	1/3	-	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-
Negativos	-	-	-	-	3/27	1/27	2/27	1/27	1/27	-	2/27	3/27	-	-

Legenda: KDa: Quilodanton; TS: Fração antigênica solúvel; TM: Fração antigênica de membrana

4.2.4 Western-blotting dos pacientes imunodeprimidos

Nos pacientes imunocomprometidos, 68,8% (22/32) do grupo S+ID reconheceram pelo menos uma banda imunogênica na fração TS (Tabela 5). O reconhecimento da banda de 40-35kDa ocorreu em quase todas as amostras deste grupo em que houve positividade de banda, com exceção de uma que reconheceu exclusivamente a faixa de 110-100KDa e outra de 53-49KDa. Na fração de TM, 53,1% (17/32) dos pacientes reconheceram alguma banda imunogênica, sendo que todos os supracitados reconheceram a banda de 40-35KDa.

A banda de 40-35KDa foi a mais frequente no grupo S+ID (62,5% e 53,1%, respectivamente para TS e TM) ($p < 0,0001$) quando comparada com os pacientes do grupo S-ID.

Houve menor intensidade de marcação das bandas proteicas por pacientes do grupo S+ID, quando comparados aos pacientes do grupo P, mas a banda de 40-35kDa foi facilmente visualizada em ambas frações antigênicas (Figura 12).

Tabela 5 – Frequência de reatividade de amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID) e negativos (S-ID) para *S. stercoralis* no *Western-blotting* utilizando as frações solúvel (TS) e membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

KDa	Fração antigênica	S+ID n (%)	S-ID n (%)
110-100	TS	8 (25)	5 (18.5)
	TM	6 (18.8)	-
53-49	TS	5 (15.6)	6 (22.2)
	TM	6 (18.8)	-
40-35	TS	20 (62.5)	2 (7.4)
	TM	17 (53.1)	1 (3.7)
29	TS	-	1(3.7)
	TM	4 (12.5)	-
23	TS	2 (6.3)	3 (11.1)
	TM	1(3.2)	-
15	TS	-	-
	TM	3 (9.4)	-

Grupo P: TS

Grupo P: TM

Grupo S+ID: TS

Grupo S+ID: TM

Figura 12 – Intensidade de marcação da membrana de PVDF após a reiazação do *Western-Blotting* em pacientes imunocompetentes (grupo P) e imunocomprometidos (grupo S+ID), usando frações de antígeno solúvel (TS) e de membrana (TM) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, respectivamente.

4.2.5 Western-blotting 2D

Houve reconhecimento de diversos *spots* em ambas frações antigênicas, sobretudo daqueles localizados em pH neutro ou levemente ácido próximo aos 35KDa (Figura 13 e 14, respectivamente).

Figura 13 - Western-blotting 2D utilizando como antígeno a fração solúvel (TS) de larva de *S. venezuelensis*. Foram utilizados *pool* soros de indivíduos dos grupos P (*S. stercoralis*), OP (*S. mansoni*) e N (negativo) na reação de WB 2D.

Figura 14 - Western-blotting 2D utilizando como antígeno a fração de membrana (TM) de larva de *S. venezuelensis*. Foram utilizados *pool* soros de indivíduos dos grupos P (*S. stercoralis*), OP (*S. mansoni*) e N (negativo) na reação de WB 2D.

4.3 Imunoproteômica

4.3.1 Identificação de proteínas gel 1D

Após a identificação da banda de 40-35KDa por pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos, procedeu-se com a excisão do gel na altura correspondente para análise por espectrometria de massas (Figura 15). Após a obtenção dos espectros de massas, o conjunto de dados foi submetido à busca em banco de dados. O resultado da identificação das proteínas e as suas respectivas abundâncias dentro da área excisada estão representados nas Tabelas 6 e 7. Observou-se que em ambas frações antigênicas, a actina foi a proteína de maior abundância na área recortada para antígeno solúvel TS e a galectina para o antígeno de membrana TM.

Figura 15 – Géis réplica 1D corado por Coomassie Blue das frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) indicando local da excisão das bandas destinadas à identificação por espectrometria de massas. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons.

Tabela 6 – Proteínas identificadas na fração solúvel de larvas filarioides (TS) de *S. venezuelensis*. Para este estudo foram utilizados o termo *Strongyloides* para busca no uniprot (www.uniprot.org) e as proteínas foram identificadas por dois peptídeos com intervalo de confiança de 95%. As proteínas presentes na tabela apresentaram abundância >2%.

TS	Acesso	Proteína	Score	Cobertura	Peptídeos únicos	MM [kDa]	Abundância
35kDa	A0A090L6V9	Actina	202,67	49,47	2	41,8	68,35%
	A0A090KPU4	Galectina	10,18	12,23	3	31,4	3,93%
	A0A090KYR4	Glutamina sintetase/guanido quinase, domínio catalítica e ATP: guanido fosfotransferase	26,59	23,96	7	40,3	3,07%
	A0A090MZE5	Malato desidrogenase	41,23	30,27	9	36,5	2,91%
	A0A090L778	Hemicentina-1	20,21	1,05	4	544,2	2,56%
	A0A090MMP9	Galectina	21,36	19,78	4	31,9	2,28%
40kDa	A0A090L6V9	Actina	153,29	29,79	9	41,8	48,33%
	A0A090LDK1	Frutose-bifosfato aldolase	91,77	43,68	10	39,5	13,23%
	A0A090KYR4	Glutamina sintetase/guanido quinase, domínio catalítica e ATP: guanido fosfotransferase	62,31	22,84	6	40,3	12,86%
	A0A090MX65	Tropomiosina	84,37	33,04	13	39,1	9,40%
	A0A090LLS9	Immunoglobulina subtipo domínio 2	49,60	40,49	14	36,3	3,34%
	A0A090MYL8	Frutose-bisfosfate aldolase	13,99	11,48	4	39,5	2,52%

TS: Massa molecular experimental excisada do gel. MM: Massa molecular teórica do fragmento identificado.

Tabela 7 – Proteínas identificadas na fração de membrana de larvas filarioides (TM) de *S. venezuelensis*. Para este estudo foram utilizados o termo *Strongyloides* para busca no uniprot (www.uniprot.org) e as proteínas foram identificadas por dois peptídeos com intervalo de confiança de 95%. As proteínas presentes na tabela apresentaram abundância >2%.

TM	Acesso	Descrição	Score	Cobertura	# Peptídeos únicos	MM [kDa]	Abundância (%)
35kDa	A0A090KPU4	Galectina	12,80	14,03	2	31,4	29,02
	A0A090MMP9	Galectina	22,97	24,10	4	31,9	24,54
	A0A090L6V9	Actina	55,84	33,24	9	41,8	10,15
	A0A090N071	Proibitina-2	7,23	7,77	2	33,0	3,66
	A0A090MYP9	Proibitina	30,43	27,21	7	29,9	3,16
	A0A090LJ53	Anexina	6,90	5,97	2	36,2	2,85
	A0A090LNQ1	Cadeia pesada da miosina	27,76	4,91	7	227,2	2,36
	A0A090MYI6	Calponina	17,57	10,80	5	64,7	2,26
40kDa	A0A090L6V9	Actina	116,81	46,81	12	41,8	36,10
	A0A090LTL1	Laminina	52,34	22,60	14	67,4	6,70
	A0A090KTV2	Galectina	19,92	14,10	4	35,4	6,26
	A0A090LKA7	Malato desidrogenase	30,89	17,16	4	35,0	5,36
	A0A090MYI6	Calponina	42,05	18,64	8	64,7	3,80
	A0A090MU21	Gliceraldehide-3-fosfato desidrogenase	16,58	15,54	3	36,6	3,84
	A0A090LG99	Calponina	59,44	36,53	10	42,6	2,97
	A0A090LNQ1	Cadeia pesada da miosina	83,69	13,87	16	227,2	2,74
	A0A090LDK1	Frutose-bifosfato aldolase	29,66	26,37	6	39,5	2,02

TM: Massa molecular experimental excisada do gel. MM: Massa molecular teórica do fragmento identificado.

4.3.2 Identificação de proteínas gel 2D

Alguns *spots* foram excisados (Figura 16) após a superposição das membranas de PVDF reveladas após o WB sob o SDS-PAGE 12%. Após a obtenção dos espectros de massas, o conjunto de dados foi submetido à busca em banco de dados. O resultado da identificação das proteínas, e as suas abundâncias dentro da área recortada está representado nas Tabelas 8 e 9. A actina foi a proteína de maior abundância na área recortada para antígeno solúvel TS e a galectina para o antígeno de membrana TM.

Figura 16 – Géis réplica 2D corados por *Coomassie Blue* das frações antigênicas solúvel (TS) e de membrana (TM) indicando local da excisão das bandas (numeradas) destinadas à identificação por espectrometria de massas. MM: padrão de massa molecular. KDa: Quilodaltons.

Tabela 8 – Proteínas selecionadas e identificadas na fração antigênica solúvel de larvas filarioides (TS) de *S. venezuelensis* a partir da análise do *Western-blotting* bidimensional utilizando pool de soros de indivíduos positivos, com outras parasitoses e negativos.

Nº acesso	Descrição	Score	MM [kDa]	Abundância (%)
TS1				
A0A090L6V9	Actina	82,26	41,8	98,85
A0A090LQY6	Pirofosfatase inorgânica	3,79	40,2	1,15
TS2				
A0A090L6V9	Actina	408,61	41,8	98,53
A0A090LPB4	Catepsina	15,74	49,4	0,49
A0A090LLS9	Imunoglobulina subtipo 2 (domínio)	25,71	36,3	0,35
A0A090LTL1	Laminina (domínio)	30,50	67,4	0,27
A0A090LLA0	Integrina beta	5,54	53,1	0,11
A0A090LP37	Proteína não caracterizada	6,16	268,1	0,11
A0A090LAN6	Adenosilcisteinase	8,54	47,4	0,08
A0A090L103	Adenilciclase	4,00	54,1	0,03
A0A090MYF5	Isocitrato desidrogenase (NAD)	6,36	39,4	0,03
TS3				
A0A090KYR4	Glutamina sintetase (domínio catalítico)	81,96	40,3	63,82
A0A090LDK1	Aldolase	58,50	39,5	27,32
A0A090L6V9	Actina	36,40	41,8	6,86
A0A090MU21	Desidrogenase (gliceraldeído 3-fosfato)	11,05	36,6	2,00
TS4				
A0A090L6V9	Actina	140,07	41,8	93,22
A0A090L4Y1	Proteassoma (subunidade alfa)	4,65	27,9	2,23
A0A090KYE4	ATPase (transporte de cálcio)	4,73	130,1	2,16
A0A090L103	Adenilil ciclase	6,09	54,1	1,15
A0A090MZU3	Profilina	4,24	13,2	0,67
A0A090LTL1	Laminina	7,64	67,4	0,58

Tabela 9 – Proteínas selecionadas e identificadas na fração antigênica de membrana de larvas filarioides (TM) de *S. venezuelensis* a partir da análise do *Western-blotting* bidimensional utilizando pool de soros de indivíduos positivos, com outras parasitoses e negativos.

Nº acesso	Descrição	Score	MM [kDa]	Abundância (%)
TM1				
A0A090KPU4	Galectina	31,94	31,4	39,10
A0A090L6V9	Actina	73,56	41,8	38,18
A0A090MMP9	Galectina	58,89	31,9	17,01
A0A090MRU7	Cadeia leve da miosina	5,71	224,5	1,59
A0A090LLS9	Imunoglobulina subtipo 2 (domínio)	7,67	36,3	1,34
A0A090LUI1	Catepsina	5,84	41,2	1,05
A0A090KTJ0	ATPase subunidade E	4,87	25,5	0,78
A0A090L1H8	ATPase (transporte de íons, Na ⁺ /K ⁺)	5,23	108,5	0,47
A0A090LDR7	ATP sintase subunidade beta	8,34	57,0	0,29
A0A090MYF5	Isocitrato desidrogenase (NAD)	5,22	39,4	0,19
TM2				
A0A090KPU4	Galectina	47,49	31,4	42,49
A0A090MMP9	Galectina	77,96	31,9	30,11
A0A090L6V9	Actina	49,23	41,8	14,41
A0A090KZI0	Galectina	4,53	31,3	10,29
A0A090LJ53	Anexina	9,72	36,2	1,15
A0A090MSJ1	Proteassoma subunidade 14 não-ATPase (26S)	5,39	34,0	0,67
A0A090LLS9	Imunoglobulina subtipo 2 (domínio)	12,72	36,3	0,66
A0A090LHW4	Sucinato desidrogenase	4,89	70,3	0,22
TM3				
A0A090MMP9	Galectina	75,92	31,9	52,67
A0A090KPU4	Galectina	44,80	31,4	39,40
A0A090L6V9	Actina	36,39	41,8	7,93
TM4				
A0A090MMP9	Galectina	76,65	31,9	47,69
A0A090KPU4	Galectina	39,27	31,4	26,82
A0A090KZI0	Galectina	7,20	31,3	19,65
A0A090L6V9	Actina	14,01	41,8	3,19
A0A090LJ53	Anexina	5,13	36,2	1,77
A0A090MYP9	Prohibitina	9,71	29,9	0,88
TM5				
A0A090KPU4	Galectina	48,11	31,4	65,86
A0A090KZI0	Galectina	14,66	31,3	21,64
A0A090MMP9	Galectina	45,68	31,9	6,27
A0A090MYP9	Prohibitina	28,95	29,9	3,27
A0A090L6V9	Actina	11,79	41,8	1,85
A0A090KRH2	Sinaptotagmina	8,64	50,0	0,44
A0A090KX90	Toxina da família MTX2	4,84	34,8	0,37
A0A090LHW4	Sucinato desidrogenase	4,87	70,3	0,32

4.4 Utilização da galectina como fonte antigênica

4.4.1 Caracterização das frações purificadas

Após a purificação da fração antigênica TS obteve-se concentração de 2,8mg/mL e 0,4mg/mL das frações resultantes não ligada (NL) e galectina (Gal), respectivamente. A análise por SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes 1D (Figura 17) foi realizada para observar o perfil das bandas para cada fração antigênica. A purificação com a fração TM não foi realizada pela incompatibilidade de tampões presentes na mistura proteica.

Figura 17 – SDS-PAGE 12% corado por Nitrato de Prata indicando perfil proteico das frações solúvel (TS), Não ligada (NL) e galectina (Gal). MM: Padrão de Massa Molecular; TS: fração antigênica solúvel; NL: fração Não ligada; Gal: Galectina.

4.4.2. Western-blotting anti-galectina

O WB utilizando anticorpo anti-galectina confirmou a presença de uma banda de 40KDa (Figura 18).

Figura 18 – Western-blotting revelado por substrato Quimioluminescente utilizando a fração Galectina (Gal). MM: Massa molecular. KDa: Quilodaltons.

4.4.3 ELISA

Os parâmetros de diagnóstico do ELISA com frações não ligada (NL) e galectina (Gal) como fonte antigênica estão dispostos nas curvas ROC (Figura 19). Os antígenos NL e Gal apresentaram sensibilidade de 90% e especificidade de 89,8% e 75%, respectivamente. O *cut-off* das reações foram 0,441 para fração NL e 0,224 para Gal (Figura 20).

Figura 19 – Curvas ROC, segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações não ligada - NL (A) e Galectina - Gal (B) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses.

Figura 20 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo P, n=20), com outras parasitoses (grupo OP, n=22) e negativos (grupo N, n=27) por ELISA utilizando as frações antigênicas não ligada (NL) e galectina (Gal) derivadas de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo.

4.4.4 ELISA dos pacientes imunodeprimidos

Ao realizar o ELISA com os pacientes imunodeprimidos positivos para *S. stercoralis* (S+ID) (Figura 21A) a positividade foi de 34,4% e 18,1% nas frações não ligada e galectina, respectivamente. No grupo imunodeprimidos negativo para *S. stercoralis* (S-ID) houve reatividade inespecífica em 14,8% e 7,5% nas frações não ligada e galectina, respectivamente (Figura 21B).

Figura 21 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro de pacientes imunodeprimidos positivos (S+ID, n=32) e negativos (S-ID, n=27) para *S. stercoralis* utilizando as frações antigênicas não ligada (NL) e galectina (Gal) derivadas de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha apresentam ELISA positivo.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da estrogiloidíase é baseado em técnicas parasitológicas, sobretudo aquelas que possuem o termohidrotropismo larvário positivo como fundamento (Baermann, 1917; Moraes, 1948; Rugai *et al.*, 1954) ou por técnicas de cultura como a placa de ágar (Koga *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 2013). Entretanto, quando realizadas isoladamente, apresentam baixa sensibilidade, principalmente pela intermitência na liberação larvária e baixa carga parasitária nos casos crônicos, sendo necessárias coletas de múltiplas amostras fecais ou associação entre técnicas parasitológicas. Estes métodos não costumam ser adotados na rotina laboratorial dada a quantidade de amostra fornecida e o incorreto estado de conservação, como refrigeração e utilização de substâncias conservantes (Uparanukraw *et al.*, 1999; Zaha *et al.*, 2000).

Diante dos problemas enfrentados na detecção direta de formas parasitárias de *S. stercoralis*, a literatura vem propondo medidas alternativas de diagnóstico que não dependam diretamente da liberação e detecção das larvas nos materiais biológicos. O desenvolvimento de técnicas sorológicas e moleculares, cada vez mais aprimoradas, vem sendo o objeto de estudo de diversos grupos pelo mundo. De forma geral, os valores dos parâmetros de diagnósticos das técnicas sorológicas sobressaem os das moleculares (Levanhagen e Costa-Cruz, 2014; Buonfrate *et al.*, 2018).

Muito se tem discutido sobre a forma de obtenção, caracterização e aplicação de diferentes frações antigênicas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Buonfrate *et al.*, 2015b; Nutman, 2016). A técnica mais explorada na literatura é o ensaio imunoenzimático (ELISA), seguido por alguns

relatos da utilização da reação de imunofluorescência indireta e do WB (Levenhagen; Costa-Cruz, 2014).

Neste trabalho propusemos a realização da técnica de DOT ELISA utilizando a fração antigênica heteróloga de *S. venezuelensis* que pode ser incorporada às tradicionais técnicas já realizadas no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana. O DOT ELISA já foi descrito no diagnóstico de outros parasitos ou agentes infecciosos além de *S. stercoralis*, como sendo uma técnica prática e com valores apreciáveis nos parâmetros de diagnóstico. Estudos envolvendo a detecção da infecção por *S. mansoni* apresentaram 96,3% e 94% (Pinto *et al.*, 1995), por *Trypanosoma cruzi* 97% e 89% (Cervantes-Landin *et al.*, 2014), por *Orientia tsutsugamushi* 98,5% e 96,3% (Rodkvamtook *et al.*, 2015) e por *Toxoplasma gondii* 79,5% e 78,2% (Teimouri *et al.*, 2018) de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Existem poucos trabalhos abordando a metodologia de DOT ELISA no diagnóstico da strongiloidíase humana. Van Doorn *et al.* (2007) elaboraram ensaio *Dipstick* com antígeno de *S. stercoralis* e obtiveram 91% de sensibilidade e 97,7% de especificidade com relato de reatividade cruzada para *Schistosoma* sp e *Echinococcus granulosus*. Frente aos resultados de parâmetros de diagnóstico do DOT ELISA apontados na literatura, também apostamos na padronização desta metodologia, principalmente pela possibilidade da aplicação na população imunocomprometida. Este estudo é o primeiro a utilizar o DOT ELISA a partir de frações solúvel e de membrana do antígeno heterólogo de *S. venezuelensis*.

Diante das adversidades encontradas para a padronização do DOT ELISA baseado nos protocolos descritos na literatura utilizou-se somente a fração antigênica TM de *S. venezuelensis* revelado com substrato quimioluminescente. Dessa forma, obtivemos 95% de sensibilidade e 85,7% de especificidade corroborando com os achados da literatura. A fração TS também foi testada, porém não apresentou diferenças na reatividade em amostras dos grupos de pacientes com outras parasitoses (OP) e negativos (N) e, por conseguinte, não a consideramos uma possibilidade diagnóstica.

Ao comparar o ELISA com o DOT ELISA utilizando a fração TM, observamos os mesmos valores de sensibilidade (95%). Todos os indivíduos que apresentavam reatividade cruzada no ELISA também apresentaram no DOT ELISA, entretanto, nesta última houve ainda cruzamento com *Ascaris lumbricoides* e *Blastocystis* sp. Esse resultado aponta para uma maior sensibilidade em relação a especificidade, reforçando sua utilização como técnica de triagem sorológica.

A partir desses dados a técnica de DOT ELISA, mesmo sendo revelada com substrato quimioluminescente, pode ser considerada uma alternativa a ser incorporada ao diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana, sobretudo em inquéritos epidemiológicos. Esta técnica uma vez padronizada possui ainda algumas vantagens sobre as demais, pois pode ser executada de forma individualizada não necessitando de grande quantidade de reagentes, além da obtenção de resultados de forma rápida.

Após a padronização do DOT ELISA com amostras de pacientes imunocompetentes, aplicou-se a técnica em pacientes imunocomprometidos e

novamente uma análise comparativa com o ELISA foi realizada. O ELISA e o DOT ELISA foram capazes de detectar anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em nove (28,1%) pacientes imunocomprometidos positivos para *S. stercoralis* nas fezes (S+ID), no entanto somente oito pacientes apresentaram positividade nas duas técnicas.

Em relação ao grupo de pacientes imunocomprometidos e com resultados negativos para *S. stercoralis* nas fezes (S-ID), observou-se positividade somente no DOT ELISA. Ao nos depararmos com a eficiência da técnica parasitológica de diagnóstico e com o nível de imunocomprometimento dos indivíduos, utilizar uma técnica capaz de detectar anticorpos pode ser primordial para o tratamento precoce da estrongiloidíase.

São raros os trabalhos que estudam o diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana em pacientes imunocomprometidos. Os estudos presentes na literatura permeiam a temática da ocorrência de positividade sorológica. Nosso grupo já realizou um estudo soroepidemiológico com população semelhante utilizando a reação de imunofluorescência indireta em que obtivemos 21,5% de positividade (Gottardi *et al.*, 2015).

Outras pesquisas que contemplaram a detecção de anticorpos específicos em pacientes imunocomprometidos também foram realizados. Na Bahia, em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico a positividade do ELISA foi de 16% (Souza *et al.*, 2016); em Minas Gerais, Paula *et al.* (2000) realizaram imunofluorescência indireta e ELISA em crianças imunodeprimidas e a positividade foi de 8,4% e 12,1% nas respectivas técnicas; no Rio de Janeiro, Schaffel *et al.* (2001) investigaram pacientes com doenças oncohematológicas e

a sorologia foi positiva em 23,3%. Globalmente, na Tailândia, Luvira *et al.* (2016) identificaram 5,4% de positividade no ELISA em pacientes em tratamento com corticoides, com doenças oncohematológicas, transplantados e portadores do vírus HIV. Na Turquia, Erdem-Kivrak *et al.* (2017) realizaram triagem de pacientes com doença renal crônica ou transplantados de rim e encontraram apenas 0,92% de positividade no ELISA e na PCR em tempo real. Diante dessa elevada frequência na detecção de anticorpos anti-*Strongyloides*, mesmo em condições de imunocomprometimento, reforçamos a importância de realização de estudos como este que visem o aprimoramento do diagnóstico sorológico nessa população.

Os trabalhos que utilizam variações antigênicas em populações imunocomprometidas com diagnóstico parasitológico prévio são ainda mais escassos; entretanto, esses estudos são extremamente necessários dada a evolução clínica grave que a doença pode causar na população supracitada. No nosso estudo, o ELISA utilizando a fração antigênica TS apresentou maior positividade (34,4%) que a fração TM (28,1%) no grupo S+ID e nenhuma amostra foi reativa no grupo S-IC. O trabalho de Silva *et al.* (2014) utilizou pacientes positivos para *S. stercoralis* nas fezes e imunocomprometidos como aqueles portadores do vírus HIV, com diabetes, com câncer, com tuberculose e etilistas. Os autores realizaram uma comparação entre a positividade das frações solúvel e detergente pelo ELISA e constataram que a última pode ser mais efetiva no diagnóstico. Os dados deste trabalho em concordância com o de Silva *et al.* (2014) reforçam a importância de estudos envolvendo variações antigênicas sobretudo quando aplicados à população imunocomprometida.

Visando o aprimoramento do diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana, a técnica de WB foi inicialmente estabelecida como uma possibilidade de confirmação do diagnóstico sorológico.

A técnica de WB tem sido utilizada no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, com alta especificidade e sensibilidade no reconhecimento de componentes antigênicos de *S. stercoralis* ou espécies heterólogas por anticorpos presentes no soro de indivíduos com estrogiloidíase (Conway *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2003). Entretanto, esta ainda é pouco explorada quando comparada ao ELISA, pois trata-se de uma técnica que envolve muitas etapas como o SDS-PAGE, a eletrotransferência das proteínas e a reação de WB propriamente dita. Além disso é considerada uma técnica dispendiosa.

Diferentes condições de reação têm sido mencionadas na literatura utilizando antígeno heterólogo (Silva *et al.*, 2003; Gonzaga *et al.*, 2011b; Corral *et al.*, 2017) e homólogo (Siddiqui *et al.*, 1997; Sudré *et al.*, 2007; Rodpai *et al.*, 2016). Isso demonstra a necessidade de maiores padronizações nas técnicas sorológicas *in house*, sobretudo na escolha do método de extração das frações antigênicas. Não há *kits* de WB disponíveis no mercado do diagnóstico.

Neste estudo, a banda de 40-35kDa foi a única reconhecida por todos os indivíduos do grupo P nas frações antigênicas TS e TM. Essa mesma banda também foi a mais frequente em pacientes do grupo S+ID, sendo identificada em 62,5% e 53,1% nas frações antigênicas TS e TM, respectivamente. Nos pacientes do grupo P, a intensidade de marcação é maior e as bandas imunogênicas são facilmente identificadas. Já nas membranas dos pacientes do

grupo S+ID a marcação é fraca e melhor detectada com auxílio de programa específico.

Independente da preparação realizada para a produção de antígenos, resultados similares foram relatados por autores que utilizaram a fração antigênica heteróloga proveniente de *S. venezuelensis* como a banda de 45 kDa (Machado *et al.*, 2008), de 35-28kDa (Gonzaga *et al.*, 2011b) e de 40-35kDa (Corral *et al.*, 2017) utilizando amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase e imunocompetentes. As mesmas bandas também foram demonstradas por Silva *et al.* (2003) utilizando como antígeno *S. ratti*. Siddiqui *et al.* (1997) e Rodpai *et al.* (2016) utilizando antígeno homólogo identificaram a banda de 41kDa e de 29kDa como imunogênica.

Após a constatação de que, independentemente da condição imunológica dos pacientes, a banda de 40-35 KDa foi observada com maior frequência e dada a concordância com a literatura, géis replicas foram realizados e as bandas com a altura supracitada foram recortadas e enviadas para identificação proteômica. Para fortalecer a escolha das bandas o WB 2D foi realizado paralelamente com *pool* de amostras de soro de pacientes imunocompetentes, pois trata-se de uma técnica com maior precisão que utiliza dois mecanismos de separação das proteínas, definindo melhor os *spots* (O'Farrell, 1975; Rodpai *et al.*, 2017). Géis réplicas também foram realizados para excisão de *spots* dados como imunogênicos.

Em ambas preparações antigênicas, a actina e galectina foram as proteínas de maior abundância presentes nas amostras. Actina é a proteína mais abundante em células eucarióticas, sendo altamente conservada ao longo da

evolução. Tem sido descrita na participação de diversos processos celulares, incluindo contração muscular, motilidade celular, divisão celular, citocinese, sinalização celular e estabelecimento e manutenção das junções celulares e seus formatos (Fornelio *et al.*, 1995; Pollard, Borisy, 2003; Bahia *et al.*, 2006).

É válido ressaltar que o citoesqueleto proteico dos nematódeos é constituído principalmente por actina, o que pode favorecer o contato com o sistema imune do hospedeiro induzindo a produção de anticorpos. A actina foi reconhecida pelo sistema imune de indivíduos com Toxocaríase (Zhan *et al.*, 2015) e também na infecção por *Haemoncus contortus* (Yan *et al.*, 2010). Recentemente, Yan *et al.* (2014) propôs uma vacina recombinante a partir de actina de *H. contortus*, estimulando parcialmente o sistema imune promovendo proteção contra Hemoncose.

Considerando o gênero *Strongyloides*, há poucos relatos sobre a actina na literatura. Essa proteína foi observada pela primeira vez na vulva de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* a partir de microscopia confocal (Silva *et al.*, 2013). Marcilla *et al.* (2010), demonstraram a alta abundância de actina no extrato de larvas infectantes de *S. stercoralis*. Até o presente não foi avaliada a capacidade da actina em ativar o sistema imune na estrogiloidiase, assim este fato pode dar luz a questões ainda não respondidas sobre o papel dessa proteína na interação parasito-hospedeiro.

Galectinas são proteínas evolutivamente conservadas, membros da família das lectinas (Barondes *et al.*, 1994; Zuñiga *et al.*, 2001; Vasta, 2009). Elas possuem a habilidade de regular diferencialmente diversas respostas biológicas já tendo sido descrita em diversos organismos, desde primitivos até mesmo nos

homens (Vasta *et al.*, 2012). As galectinas podem estar presentes nas membranas celulares, no citosol ou ainda serem secretadas possuindo a capacidade de mediar a comunicação entre as células imunes (Rabinovich *et al.*, 2007; Rabinovich; Toscano, 2009). A função das galectinas nos nemátodos ainda não é bem compreendida, mas parece ser importante para a sobrevivência do parasita e desempenha papel importante na relação parasita-hospedeiro, podendo modular negativamente a resposta imune (Young; Meeusen, 2004).

A galectina já foi identificada em larvas infectantes de *S. stercoralis* após a digestão prolongada com tripsina (Marcilla *et al.*, 2010; Rodpai *et al.*, 2016; 2017; Ditgen *et al.*, 2018). Os genes codificantes para as proteínas em questão foram identificados em outras espécies de nematódeos parasitas incluindo *Angiostrongylus cantonsensis*, *H. contortus*, *Toxascaris leonina*, *Dirofilaria immitis*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* (Newton *et al.*, 1997; Greenhalgh *et al.*, 2000; Kiel *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2013; Gonzáles-Miguel *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2018).

Na infecção por *A. cantonsensis* foi relatado o aumento da expressão da galectina, porém seu papel na relação parasito-hospedeiro ainda não foi completamente elucidado (Shi *et al.*, 2018). Estudos em *D. immitis* relatam, por meio da utilização de proteínas recombinantes, a importante participação na manutenção do parasito no hospedeiro (Gonzáles-Miguel *et al.*, 2015). Em *T. colubriformis* a galectina foi identificada como imunorretiva (Kiel *et al.*, 2007).

Neste estudo, a galectina foi identificada principalmente na fração de membrana (TM) utilizando gel 1D e 2D. Rodpai *et al.* (2016 e 2017) realizaram estudos semelhantes a este, porém a partir do antígeno homólogo. Também foi

relatada a presença da galectina no gel 2D. Este dado reforça a utilização das galectinas como alvo de diagnóstico.

Estudos envolvendo a relação parasita-hospedeiro no gênero *Strongyloides* também exploram o papel das galectinas. Ditgen *et al.* (2018) utilizando a espécie heteróloga *Strongyloides ratti* demonstraram a presença e participação das galectinas 1 e 3 em fêmeas de vida livre e parasitas, sendo que nessa última a galectina 3 foi a mais prevalente. Foi comprovado que a galectina 3 induz a cicatrização da mucosa intestinal por indução da migração de células epiteliais reduzindo o processo inflamatório, evadindo assim o sistema imune. A proteína recombinante foi testada em animais infectados experimentalmente com *S. ratti* e os soros apresentaram reatividade no ELISA e WB.

A partir dos resultados imunoproteômicos apresentados no presente estudo e com base na importância dada pela literatura (Corral *et al.*, 2017; Rodpai *et al.*, 2017; Ditgen *et al.*, 2018), procedeu-se com a purificação da fração antigênica TS utilizando coluna de afinidade para galectinas. A purificação da fração TM foi impossibilitada dada a incompatibilidade dos tampões presentes na mistura antigênica.

A comprovação da eficácia da purificação da coluna se deu por meio da técnica de WB utilizando anticorpo específico anti-galectina. A reação foi revelada utilizando substrato quimioluminescente dada a baixa concentração de galectinas na mistura antigênica. Esse fato dificultou o emprego da proteína purificada na realização de todas as técnicas sorológicas propostas.

Esta é a primeira vez que é relatada a realização do ELISA a partir de um antígeno fracionado por afinidade proteico-específica para galectinas. Duas frações antigênicas foram testadas com pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos: a fração não ligada (NL) e a fração galectina (Gal). Ambas frações apresentaram 90% de sensibilidade e 89,8% e 75% de especificidade para NL e Gal, respectivamente. Quando aplicada à população imunodeprimida 34,4% e 18,1% dos pacientes do grupo S+ID apresentaram ELISA positivos. Esses dados nos sugerem que a galectina pode ser considerada um antígeno para detecção de anticorpos anti-*Strongyloides*. Entretanto novos estudos envolvendo outras proteínas ou contemplando associações entre proteínas devem ser conduzidos.

Diante desses dados, podemos observar que o desenvolvimento e a implementação de novos alvos no imunodiagnóstico constitui fundamental importância para o aprimoramento dos testes sorológicos e sua aplicação na população imunocomprometida.

CONCLUSÕES

- ✓ A técnica de DOT ELISA pode ser incorporada às técnicas sorológicas de diagnóstico da estrogiloidíase humana.
- ✓ A banda de 40-35KDa é reconhecida por pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos.
- ✓ Actina e galectina são as proteínas mais abundantes presentes na banda de 40-35KDa.
- ✓ As frações antigênicas brutas (solúvel e de membrana) e as purificadas (galectina e não ligada) de *S. venezuelensis* podem ser utilizadas como fonte de antígenos às técnicas sorológicas.

REFERÊNCIAS

Abanyie FA, Gray EB, Delli Carpini KW, Yanofsky A, McAuliffe I, Rana M, Chin-Hong PV, Barone CN, Davis JL, Montgomery SP, Huprikar S. Donor-derived *Strongyloides stercoralis* infection in solid organ transplant recipients in the United States, 2009-2013. *Am J Transplant*. 2015;15(5):1369-75.

Agarwala R, Wasielewski J, Biman B. Pulmonary strongyloidiasis following renal transplantation without travel to an endemic area. *Oxf Med Case Reports*. 2014;15:2014(4):83-5.

Ahrens CH, Brunner E, Basler K. Quantitative proteomics: a central technology for systems biology. *J Proteomics*. 2010;10;73(4):820-7.

Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998;19:1853-61.

Arakaki T, Hasegawa H, Asato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, Iwanaga M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. *Jap J Trop Med Hyg*. 1988;16:11-7.

Arifin N, Yunus MH, Nolan TJ, Lok JB, Noordin R. Identification and Preliminary Evaluation of a Novel Recombinant Protein for Serodiagnosis of Strongyloidiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(4):1165-1170.

Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel Mit h. Geneesk. *Laboratories Weltvrede Feestbundel*. 1917:41-7.

Bahia D, Avelar LG, Vigorosi F, Cioli D, Oliveira GC, Mortara RA. The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology*. 2006;133(Pt 3):321-9.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994;19;269(33):20807-10.

Barsoum, SR. Parasitic infections in organ transplantation. *Exp clin transpl*. 2004;2(2):258-67.

Beknazarova M, Whiley H, Ross K. Strongyloidiasis: A Disease of Socioeconomic Disadvantage. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;20:13(5).

Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, Gotuzzo E, Mena MA, Chiodini PL, Anselmi M, Moreira J, Albonico M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;9:7(5):e2214.

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. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1716–9.

Bosqui LR, Gonçalves AL, Gonçalves-Pires Mdo R, Custodio LA, de Menezes MC, Murad VA, de Paula FM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Trop*. 2015;150:190-5.

Bosqui LR, Gonçalves ALR, Gonçalves-Pires MR, Pavanelli W, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2018;145(8):1090-4.

Braga MS, Neves LX, Campos JM, Roatt BM, de Oliveira Aguiar Soares RD, Braga SL, de Melo Resende D, Reis AB, Castro-Borges W. Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania infantum* exoproteome and the relative abundance of its constituents. *Mol Biochem Parasitol*. 2014;11;195(1):43-53.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. Lei n. 11.794 de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Gobbi F, Albonico M, Gotuzzo E, Bisoffi Z; COHEMI Project Study Group. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol Infect*. 2015a;143(3):452-60.

Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2015b;21(6):543-52.

Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, Giorli G, Gobbi F, Piubelli C, Bisoffi Z. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection-A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;9:12(2):e0006229.

Castro-Borges W, Cartwright J, Ashton PD, Braschi S, Guerra Sa R, Rodrigues V, Wilson RA, Curwen RS. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis. *Proteomics*. 2007;7:1065–75.

Cervantes-Landín AY, Martínez-Martínez I, Reyes PA, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. Standardization of Dot-ELISA for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, compared to ELISA and Western blot. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6):363-8.

Concha R, Harrington JR W, Rogers AI. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:203-11.

Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. *Exp Parasitol*. 1994;79(2):99-105.

Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DMCL, Chieffi PP, Gryscek RCB. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* for using in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2015a;57:77-80

Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DMCL, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Chieffi PP, Gryscek RCB. Immunodiagnosis of human strongyloidiasis: use of six different antigenic fractions from *Strongyloides venezuelensis* parasitic females. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2015b;57:427-30.

Corral MA, Paula FM, Meisel DM, Castilho VL, Gonçalves EM, Levy D, Bydlowski SP, Chieffi PP, Castro-Borges W, Gryscek RC. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology*. 2017;144(2):124-30.

Costa-Cruz JM, Bullamah CB, Gonçalves-Pires Mdo R, Campos DM, Vieira MA. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1997;39:313-7.

Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DAO, Sopelete MC, Campos DMB, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in the ELISA for the detections of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2003;45(5):265-8.

Costa-Cruz JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP et al. Parasitologia humana. 12^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2012.

Cunha RA, de Carvalho EFG, de Sousa JEN, Costa-Cruz JM. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. *Parasitol Int*. 2017;66(5):671-6.

Diaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, Mendoza-Hernández G, Rosas G, Estrada K, Carrero JC, Sciutto E, Laclette JP, Bobes RJ. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. *Vet J*. 2013;198(3):656-60.

Ditgen D, Anandarajah EM, Reinhardt A, Younis AE, Witt S, Hansmann J, Lorenz E, García-Hernández M, Paclik D, Soblik H, Jolodar A, Seeberger PH, Liebau E, Brattig NW. Comparative characterization of two galectins excreted-secreted from intestine-dwelling parasitic versus free-living females of the soil-transmitted nematode *Strongyloides*. *Mol Biochem Parasitol*. 2018;1;225:73-83.

Dulley FL, Costa S, Cosentino R, Gamba C, Saboya R. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection after allogeneic stem cell. Transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2009;43:741–2.

Eamudomkarn C, Sithithaworn P, Sithithaworn J, Kaewkes S, Sripa B, Itoh M. Comparative evaluation of *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larval antigen for diagnosis of strongyloidiasis in an endemic area of opisthorchiasis. *Parasitol Res*. 2015;114(7):2543-51.

Eamudomkarn C, Sithithaworn P, Kamamia C, Yakovleva A, Sithithaworn J, Kaewkes S, Techasen A, Loilome W, Yongvanit P, Wangboon C, Saichua P, Itoh M, M Bethony J. Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. *PLoS One*. 2018;9:13(7):e0192598.

Erdem Kivrak E, Atalay Şahar E, Can H, Döşkaya M, Yilmaz M, Pullukçu H, Caner A, Töz H, Gürüz AY, Işıkgöz Taşbakan M. Screening of immunocompromised patients at risk of strongyloidiasis in western Turkey using ELISA and real-time PCR. *Turk J Med Sci.* 2017;12:47(3):897-901.

Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MRF, Gonçalves ALR, Rodrigues RM, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(2):153-61.

Feliciano ND, Ribeiro Vda S, Santos Fde A, Fujimura PT, Gonzaga HT, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;29:8(5):e2792.

Feliciano ND, Ribeiro VS, Gonzaga HT, Santos FA, Fujimura PT, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. *Immunol Lett.* 2016;172:89-93.

Fornelio AC, Gonzalez AJ, Caabeiro FR. Actin isoforms in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res.* 1995;81:700–2.

Gonçalves AL, Nunes DS, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology.* 2012a;139(7):956-61.

Gonçalves AL, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires Mdo R, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012b;72(1):79-84.

Gonçalves AL, de Araújo KC, Carvalho EF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. *J Helminthol.* 2016;90(3):342-6.

Gonzaga HT, Ribeiro Vda S, Cunha-Júnior JP, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):78-84.

Gonzaga HT, Vila-Verde C, Nunes DS, Ribeiro VS, Cunha-Junior JP, Costa-Cruz JM. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitology*. 2013;140:69-75.

Gonzaga HT, Nunes DDS, Ribeiro VDS, Feliciano ND, Cunha-Junior JPD, Costa-Cruz JM. Metaperiodate deglycosylation of *Strongyloides venezuelensis* larvae: Immunochemical characterization and antigen production for human strongyloidiasis diagnosis. *Acta Trop*. 2018;182:27-33.

González-Miguel J, Morchón R, Siles-Lucas M, Oleaga A, Simón F. Surface-displayed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and galectin from *Dirofilaria immitis* enhance the activation of the fibrinolytic system of the host. *Acta Trop*. 2015;145:8-16.

Gottardi M, Paula FM, Corral MA, Meisel DM, Costa SF, Abdala E, Pierrotti LC, Yamashiro J, Chieffi PP, Gryscek RC. Immunofluorescence assay for diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47(8):550-4.

Goulart de Carvalho EF, Neto de Sousa JE, Gonçalves AL, da Cunha-Junior JP, Costa-Cruz JM. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, parthenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. *Exp Parasitol*. 2015;157:117-23.

Greenhalgh CJ, Loukas A, Donald D, Nikolaou S, Newton SE. A family of galectins from *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;107,117–21.

Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Meth*. 1995;185(1):123-32.

Grove DI. Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*. 1996; 38: 251-309.

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. *Am Soc Trop Med Hyg*. 2007;77(4):683-4.

Inês Ede J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, Silva MP, Teixeira MC, Soares NM. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop*. 2011;120(3):206-10.

Ines EdJ, Sampaio Silva ML, Souza JN, Aquino Teixeira MC, Soares NM. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76:31-5.

Inês EJ, Sampaio Silva ML, de Souza JN, Galvão AA, Aquino Teixeira MC, Soares NM. Alterations in serum paraoxonase-1 activity and lipid profile in chronic alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*. *Acta Trop*. 2017;166:1-6.

Izquierdo I, Briones J, Lluch R, Arqueros C, Martino R. Fatal *Strongyloides* hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature. *Case Rep Hematol*. 2013;2013:860976.

Jarque I, Salavert M, Pemán J. Parasitic Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;1:8(1):e2016035.

Jeong MS, Hwang HG, Yu HS, Jang SB. Structure of full-length *Toxascaris leonina* galectin with two carbohydrate-recognition domains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013;69(Pt 2):168-75.

Kiel M, Josh P, Jones A, Windon R, Hunt P, Kongsuwan K. Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol*. 2007;37:1419–29.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2^a ed. Massachussetts: Blackwell Science, 2006.

Kobayashi J, Hasegawa H, Soares EC, Forli AA, Toma H, Correia- Dacal AR, Brito MC, Yamanaka A, Sato Y. Studies on prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate faecal culture method. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1996;38:4,279-84.

Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, Kita K, Ohtomo H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1991;45(4):518-21.

Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, Juarez M, Di Paolo A, Tapia L, Acosta N, Lee R, Lammie P, Abraham D, Nutman TB. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clin Vac Immunol*. 2010;17(10):1624-30.

Khuroo MS. Hyperinfection strongyloidiasis in renal transplant recipients. *BMJ Case Rep*. 2014;22;2014.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop*. 2014;135:33-43.

Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1993;37(3):655-82.

Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;93:265-75.

Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1919,11:121-55.

Luvira V, Trakulhun K, Mungthin M, Naaglor T, Chantawat N, Pakdee W, Phiboonbanakit D, Dekumyoy P. Comparative Diagnosis of Strongyloidiasis in Immunocompromised Patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;3:95(2):401-4.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires Mdo R, de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Exp Parasitol*. 2001;99(1):52-5.

Machado ER, Faccioli LH, Costa-Cruz JM, Lourenço EV, Roque-Barreira MC, Gonçalves-Pires Mdo R, Ueta MT. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Exp Parasitol*. 2008;119(1):7-14.

Marcilla A, Sotillo J, Perez-Garcia A, Igual-Adell R, Luz Valero M, Sanchez-Pino MM, Bernal D, Munoz-Antoli C, Trelis M, Toledo R, Esteban JG. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology*. 2010;137:1577-83.

Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Curr Infect Dis Rep*. 2011;13:35-46.

Masry HZ, O'Donnell J. Fatal strongyloides hyperinfection in heart transplantation. *J heart lung transpl*. 2005;24(11):1980-3.

Matrangolo FS, Liarte DB, Andrade LC, de Melo MF, Andrade JM, Ferreira RF, Santiago AS, Pirovani CP, Silva-Pereira RA, Murta SM. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol*. 2013;190(2):63-75.

Mineo JR, Silva DAO, Sopolete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia LER, Bacchin MI. Medidas de Biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. 1 ed. Uberlândia. EDUFU, 2005.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. *Rev Serv Saúde Pública*. 1948;1:507-624.

Mota-Ferreira DM, Gonçalves-Pires Mdo R, Júnior AF, Sopolete MC, Abdallah VO, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. *Acta Trop*. 2009;109(2):103-7.

Neter J, Kurtner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. 4ª ed. Illinois: Richard D. Irwing, 1996.

Neves LX, Sanson AL, Wilson RA, Castro-Borges W. What's in SWAP? Abundance of the principal constituents in a soluble extract of *Schistosoma mansoni* revealed by shotgun proteomics. *Parasit Vectors*. 2015;19(8):337.

Newton SE, Monti JR, Greenhalgh CJ, Ashman K, Meeusen EN. cDNA cloning of galectins from third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;86:143–53.

Northern C, Grove DI. *Strongyloides stercoralis*: antigenic analysis of infective larvae and adult worms. *Int J Parasitol*. 1990;30(3):381-7.

Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*. 2016;16:1-11.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-21.

Orlent H, Crawley C, Cwynarski K, Dina R, Apperley J. Strongyloidiasis pre and post autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2003;32:115-7.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:967-72.

Padrón G, Domont GB. Two decades of proteomics in Latin America: A personal view. *J Proteomics*. 2014;31;107C:83-92.

Paula FM, de Castro E, Gonçalves-Pires Md, Marçal Md, Campos DM, Costa-Cruz JM. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(1):51-5.

Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*. 2011;138(11):1331-40.

Paula FM, Gottardi M, Corral MA, Chieffi PP, Gryscek RCB. Is the agar plate culture a good tool for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in candidates for transplantation? *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2013;55(4).

Paula FM, Malta FM, Corral MA, Marques PD, Gottardi M, Meisel DMCL, Yamashiro J, Pinho JRR, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Gryscek RCB, Chieffi PP. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* for serological and molecular methods among immunosuppressed patients: a comparative study. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2016;58:63.

Pinto PL, Kanamura HY, Silva RM, Rossi CR, de Andrade Júnior HF, Amato Neto V. Dot-ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to *Schistosoma mansoni* worm and egg antigens, associated with egg excretion by patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(2):109-15.

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003;21:112(4),453-65.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(5):513-20.

Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):338-52.

Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;125(1-2):73-81.

Rebello KM, Barros JS, Mota EM, Carvalho PC, Perales J, Lenzi HL, Neves-Ferreira AG. Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis*, a human parasitic nematode. *J Proteomics*. 2011;24:74(9):154559.

Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(e-2002):1-10.

Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, Wongkham C, Insawang T, Maleewong W. *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol Res*. 2016;115(10):4007-12.

Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, Wongkham C, Insawang T, Maleewong W. Identification of antigenic proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. *Parasitol Res*. 2017;116(6):1687-93.

Rodkvamtook W, Zhang Z, Chao CC, Huber E, Bodhidatta D, Gaywee J, Grieco J, Sirisopana N, Kityapan M, Lewis M, Ching WM. Dot-ELISA Rapid Test Using Recombinant 56-kDa Protein Antigens for Serodiagnosis of *Scrub Typhus*. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(5):967-71.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes: modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1954;53:248-50.

Said T, Nampoory MR, Nair MP, Halim MA, Shetty A, Kumar AV, Mokadas E, Elsayed A, Johnny KV, Samhan M, Al-Mousawi M. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. *Transplantation Proceedings*. 2007;39(4):1014-5.

Sanches BF, Morgado J, Carvalho N, Anjos R. Multiple parasitic infections in a cardiac transplant recipient. *BMJ Case Rep*. 2015;24:2015.

Schaeffer MW, Buell JF, Gupta M, Conway GD, Akhter SA, Wagoner LE. *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome after Heart Transplantation: case report and review of the literature. *J heart lung transpl*. 2004;23:905-11.

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. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(4):346-50.

Siddiqui AA, Koenig NM, Sinensky M, Berk SL. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitol Res*, 1997;83:655-8.

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(5):687-91.

Silva CV, Gonçalves AL, Cruz L, Cruz MC, Ueta MT, Costa-Cruz JM. F-actin accumulates in the vulva of female *Strongyloides venezuelensis*. *J Helminthol*. 2013;87(3):301-4.

Silva H, de Carvalho CJ, Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. *Parasitol Int*. 2014;63(6):790-3.

Shi W, Xue C, Su XZ, Lu F. The roles of galectins in parasitic infections. *Acta Trop*. 2018;177:97-104.

Soblik H, Younis AE, Mitreva M, Renard BY, Kirchner M, Geisinger F, Steen H, Brattig NW. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti*--identification of stage-specific proteases. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(12):M111.010157.

Souza JN, Inês Ede J, Santiago M, Teixeira MC, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* infection in patients with systemic lupus erythematosus: diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. *Int J Rheum Dis*. 2016;19(7):700-5.

Sudre AP, Siqueira RC, Barreto MGM, Peralta RHS, Macedo HW, Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitol Res*. 2007;101:1117-23.

Teimouri A, Modarressi MH, Shojaei S, Mohebbi M, Zouei N, Rezaian M, Keshavarz H. Detection of toxoplasma-specific immunoglobulin G in human sera: performance comparison of in house Dot-ELISA with ECLIA and ELISA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(8):1421-9.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:967-73.

Valar C, Keitel E, Dal Prá RL, Gnatta D, Santos AF, Bianco PD, Sukiennik TCT, Pegas KL, Bittar AE, Oliveira KT, Garcia VD. Parasitic Infection in Renal Transplant Recipients. *Transpl Proceed*. 2007;39:460-2.

Valledor L, Jorrín J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *J Proteomics*. 2011;74(1):1-18.

Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JC, Wismans PJ, Sarfati C, Vervoort T, van Gool T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):438-42.

Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*, 2009;7(6):424-38.

Vasta GR, Ahmed H, Nita-Lazar M, Banerjee A, Pasek M, Shridhar S, Guha P, Fernández-Robledo JA. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front Immunol*. 2012;13;3:199.

Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, Deelder AM, Palmblad M. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics*. 2012;12(11):1860-9.

Vilela EG, Clemente WT, Mira RRL, Torres HOG, Veloso LF, Fonseca LP, De Carvalho LR, Fonseca MdC, Franca Lima AS. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after liver transplantation: case report and literature review. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:132-6.

Viney ME, Lok JB. *Strongyloides* spp. WormBook. 2007;23:1-15.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nat Biotechnol*. 1996;14:61-5.

World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. Strongyloidiasis. Geneva: WHO; 2016. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/strongyloidiasis/en/> acesso em 12 de junho de 2016.

Yan F, Xu L, Liu L, Yan R, Song X, Li X. Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *Vet J*. 2010;185:174–9.

Yan R, Wang J, Xu L, Song X, Li X. DNA vaccine encoding *Haemonchus contortus* Actin induces partial protection in Goats. *Acta Parasitol*, 2014;59(4):698-709.

Young AR, Meeusen EN. Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J*, 2004;19:601-6.

Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A. Strongyloidiasis-progress in diagnosis and treatment. *Intern Medicine*. 2000;39:695-700.

Zhan B, Ajmera R, Geiger SM, Goncalves MTP, Liu Z, Wei J, Wilkins PP, Fujiwara R, Gazzinelli-Guimaraes PH, Bottazzi MB, Hotez P. Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. *Trop Med Int Health*, 2015;20:(12),1787–96.

Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KI, Rabinovich GA. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infect Immun*. 2001;69(11):6804-12.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M __ F __
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M __ F __
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "IMUNODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA FRENTE A DIFERENTES EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE *Strongyloides venezuelensis*.
PESQUISADOR: Dr. Ronaldo César Borges Gryschek
CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL nº: 39.680 (CREMESP)
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 (três) anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem por objetivo inicial conhecer qual ou quais são os melhores métodos de diagnóstico da

infecção por *S. stercoralis*, sobretudo frente à imunodepressão. O conhecimento das melhores técnicas de diagnóstico da parasitose tem por objetivo reconhecer as pessoas infectadas, sobretudo os indivíduos imunodeprimidos em determinada área e tratá-las, antes do evento doença se agravar, com o objetivo final de eliminar essa doença desse local.

2. Os trabalhos executados pretendem avaliar os indivíduos com relação à infecção por *Strongyloides stercoralis*, através do exame parasitológico, isto é, da busca de larvas do parasito em amostras de fezes; de métodos de imunodiagnóstico, isto é, a detecção de anticorpos presentes no sangue, que são formados contra o parasito e da detecção do DNA, ou seja, material genético do parasito nas fezes (por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR)). Desses procedimentos, as técnicas da observação das larvas do parasito nas fezes são bem conhecidas, mas não são usadas de forma rotineira nos laboratórios de análises clínicas. Da mesma forma, a pesquisa de anticorpos contra o parasito, também são bem conhecidas, porém não são utilizadas em rotina diagnóstica. Já o processo de identificação do DNA do parasito nas fezes, ainda não é considerado para uso rotineiro, mas já existem estudos conhecidos que utilizaram esses métodos com sucesso. Os casos onde os exames comprovarem uma positividade para *S. stercoralis* serão avaliados e encaminhados para o tratamento que for mais apropriado ao estado clínico do paciente. Esse projeto constitui um avanço na aplicação de técnicas de diagnóstico da estrongiloidíase, uma vez que o diagnóstico através de métodos parasitológico de fezes, não é utilizado na rotina laboratorial, e isso diminui a possibilidade de diagnóstico e consequente tratamento precoce da doença, principalmente em condições de imunodepressão, além de permitir a adoção de medidas que possam eliminar a transmissão da parasitose. Deve ficar claro que sua participação é totalmente livre e voluntária e que sua eventual recusa em participar do estudo não ocasionará nenhum tipo de prejuízo pessoal ao (à) Sr(a) e sua família.
3. Sua participação no estudo consiste em:
 - A. Fornecer uma amostra de fezes
 - B. Fornecer uma amostra de sangue (7 mL), através da punção de uma veia periférica no antebraço.
4. Tais procedimentos não envolvem risco importante à sua saúde. No entanto, a obtenção da amostra de sangue pode ocasionar desconforto em função da picada para a coleta. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.
5. O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de larvas de *S. stercoralis* nas fezes ou anticorpos contra o mesmo no sangue. Nesse caso o participante será tratado com o remédio adequado. Além disso, poderão ser detectadas outras parasitoses intestinais que também serão tratadas de forma adequada. O maior benefício será, no entanto, para todos os imunodeprimidos, pois a verificação da melhor forma de diagnosticar os doentes permitirá o seu tratamento precoce e evitará a possibilidade de agravamento da parasitose.
6. Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.
7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek que poderá ser encontrado no Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na A. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 500, prédio II, 2º andar, telefone 11- 3061-8220. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – telefone 11 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20; FAX 11 3069-6442 ramal 26 – email: cappesq@hcnet.usp.br
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento, se for o caso.
9. Direito de confidencialidade – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados. Os resultados dos exames serão fornecidos individualmente aos pacientes durante seu acompanhamento ambulatorial. Se

consentido, os dados dos exames constarão nos prontuários dos pacientes para o acompanhamento da rotina ambulatorial.

11. Despesas e compensações: não há nenhuma espécie de despesa pessoal para o participante em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e remédios que venham a ser indicados no tratamento de alguma parasitose identificada. Da mesma forma não há compensação financeira relacionada à sua participação. Caso surja alguma despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12. Solicitamos também sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR *S. stercoralis* EM PACIENTES COM IMUNODEPRESSÃO"

Eu discuti com o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou também claro que a minha participação é isenta de despesas.. Concordo voluntariamente a participar desse estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente / representante legal

São Paulo, _____ de 201__.

Assinatura de testemunha, para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

São Paulo, _____ de 201__.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo

Dr. Ronaldo César Borges Gryscek

Apêndice B – Parecer do Comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DA EMENDA		
Título da Pesquisa: IMUNOPROTEÔMICA APLICADA AO APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA		
Pesquisador: RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE		
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.		
Versão: 2		
CAAE: 03203513.8.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.664.722		
Apresentação do Projeto:		
<p>O Projeto tem como título "Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento diagnóstico da estrogiloidíase humana" e se caracteriza por ser uma Emenda ao projeto aprovado há alguns anos, intitulado "Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a diferentes extratos antigênicos".</p> <p>Os AA se propõem a identificar proteínas do parasita em amostras de sangue estocadas (obtidas no projeto original "Imunodiagnóstico") de 90 pacientes de 10 a 60 anos, dos quais 30 portadores da referida parasitose.</p> <p>As Emendas se referem essencialmente à implementação das técnicas diagnósticas utilizadas no primeiro estudo.</p>		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo primário:		
Implementar técnicas sorológicas (Técnica Imunoenzimática - ELISA e Western-Blot - WB) para o		
<p>Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5ª andar Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cesp@hc.fm.usp.br</p>		
Página 01 de 03

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer nº 664.722

diagnóstico da esrongiloidíase humana, utilizando antígenos brutos de larvas filarióides e fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis*.

Objetivos secundários:

Comparar extratos dos estágios evolutivos - larvas filarióides e fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* -, através da eletroforese em gel de poliacrilamida uni e bidimensional.

Aplicação e avaliação das frações do extrato bruto dos estágios evolutivos, larva filarióide e fêmea partenogênica de *S. venezuelensis*, no diagnóstico da esrongiloidíase humana, utilizando as técnicas de ELISA e WB.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos.

Benefícios : a serem avaliados no longo prazo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e o trabalho não terá maiores dificuldades operacionais, dado estar inserido em um projeto maior.

O trabalho tem sua relevância aumentada tendo-se em vista sua finalidade acadêmica de realização de Doutorado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Dispensados da aplicação de TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_704788_E1.pdf	22/06/2018 15:29:00		Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cep@cepa.fhcim.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.854.722

Outros	ARTIGODADISSERTACAO_MARCELO ANDRETTACORRAL_07_12_2015.pdf	14/06/2016 15:35:50	RONALDO CESAR BORGES	Aceito
Outros	DISSERTACAODEMESTRADO_MARCELOANDRETTACORRAL_07_12_2015.pdf	14/06/2016 15:34:21	RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Doutorado_MarceloAndrettaCorral2016.pdf	14/06/2016 15:32:20	RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE	Aceito
Outros	Parecer_CEPDMIP.pdf	25/04/2016 11:46:03	RONALDO CESAR BORGES	Aceito
Outros	formulario_para_submissao_de_emendas_e_brochuras.pdf	25/04/2016 11:43:48	RONALDO CESAR BORGES	Aceito
Outros	carta_encaminhamento.pdf	25/04/2016 11:42:19	RONALDO CESAR BORGES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CAPEPESQ MARCELO FINAL.docx	18/03/2013 15:29:51		Aceito
Outros	anuencia do Laboratorio Central.jpg	19/03/2013 15:27:32		Aceito
Outros	Parecer da Comissão de ética e Pesquisa.pdf	07/11/2012 13:48:57		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTRO ASSINADA.pdf	07/11/2012 13:47:49		Aceito
Outros	CAPEPESQ MARCELO.docx	09/05/2012 15:18:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de Consentimento.docx	09/05/2012 15:17:31		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Agosto de 2016

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2561-7585

Fax: (11)2561-7585

E-mail: expesq.adm@hc.fm.usp.br

Apêndice C – Parecer do Comitê de ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0123/10**, intitulado: **"INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR S. STERCORALIS EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE IMUNODEPRESSÃO"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Ronaldo César Borges Gryscek**

Pesquisador (a) Executante: **Fabiana Martins de Paula**

CAPPesq, 26 de Março de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcfnet.usp.br / secretariacappesq2@hcfnet.usp.br

Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens

M. A. CORRAL¹, F. M. PAULA^{1,2}, D. M. C. L. MEISEL¹, V. L. P. CASTILHO³,
E. M. N. GONÇALVES³, D. LEVY⁴, S. P. BYDLÓWSKI⁴, P. P. CHIEFFI⁵,
W. CASTRO-BORGES⁶ and R. C. B. GRYSCHKE^{1,2*}

¹ Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

² Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brazil

³ Divisão de Laboratório Central, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Laboratório de Investigação Médica (LIM-31), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵ Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa, São Paulo, SP, Brazil

⁶ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

(Received 1 April 2016; revised 9 August 2016; accepted 15 August 2016; first published online 29 November 2016)

SUMMARY

Strongyloides venezuelensis is a parasitic nematode of rodents that is frequently used to obtain heterologous antigens for immunological diagnosis of human strongyloidiasis. The aim of this study was to identify antigens from filariform larvae of *S. venezuelensis* for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. Soluble and membrane fractions from filariform larvae of *S. venezuelensis* were obtained in phosphate saline (SS and SM) and in Tris-HCl buffer (TS and TM), and were analysed by Western blotting. Different antigenic components were recognized by IgG antibodies from the sera of strongyloidiasis patients. Highest recognition was observed for a 30–40 kDa mass range present in all antigenic fractions. The band encompassing this mass range was then excised and subjected to mass spectrometry for protein identification. Immunoreactive proteins identified in the soluble fractions corresponded to metabolic enzymes, whereas cytoskeletal proteins and galectins were more abundant in the membrane fractions. These results represent the first approach towards identification of *S. venezuelensis* antigens for use in immunodiagnostic assays for human strongyloidiasis.

Key words: *Strongyloides venezuelensis*, immunodiagnostic, antigens, actin, galectin.

INTRODUCTION

Strongyloidiasis is a parasitic infection caused by *Strongyloides stercoralis*, a widely distributed nematode, particularly in the tropical areas (Olsen *et al.* 2009). The definitive diagnosis of this disease relies on the visualization of larvae, especially in the stool, being considered of low sensitivity. Therefore, serological techniques have been used as complementary alternatives to parasitological diagnosis (Levenhagen and Costa-Cruz, 2014).

The serological techniques include enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting (WB), the former being the most extensively used for the diagnosis of strongyloidiasis, especially for its practicality in analysing large numbers of serum samples (Requena-Mendez *et al.* 2013; Levenhagen and Costa-Cruz, 2014; Buonfrate *et al.* 2015). In turn, WB has been a useful tool for

many immunological approaches in various diseases, but few studies have reported its use in immunodiagnosis of strongyloidiasis (Sato *et al.* 1990; Conway *et al.* 1993; Lindo *et al.* 1994; Ravi *et al.* 2002). In this context, molecular mass ranges of proteins have been described as immunodominants (Conway *et al.* 1993) from one-dimensional (1D) gel electrophoresis, but the exact identities of the proteins remain to be determined.

A number of genome and transcriptome sequencing initiatives have allowed the identification of parasite proteins using proteomic approaches, including those devoted to the *Strongyloides* genus (Marcilla *et al.* 2010; Hunt *et al.* 2016). In addition, providing antisera are available, immunoreactive proteins can be detected and selected for protein identification, through the technique collectively termed immunoproteomics. This approach has been shown to be highly promising for the diagnosis of various infectious agents (Yan *et al.* 2010; Zhan *et al.* 2015). As for the diagnosis of human strongyloidiasis, heterologous antigens from *Strongyloides ratti* and *Strongyloides venezuelensis* can be easily obtained, and therefore they represent valuable sources of antigens to be explored (Levenhagen

* Corresponding author: Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo. Instituto de Medicina Tropical, prédio II, 2º andar, Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, Cerqueira Cesar, 05403-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: rcgry@usp.br

and Costa-Cruz, 2014). In this study, using a combination of 1D WB and mass spectrometry, we revealed the protein constituents (from filariform larvae of *S. venezuelensis*) mostly recognized by the antisera of individuals with strongyloidiasis.

MATERIAL AND METHODS

Serum samples

A total of 46 serum samples from individuals registered at the 'Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP)' were divided into two groups: group I consisted of 20 patients who were shedding *S. stercoralis* larvae only in their feces; group II included 26 patients infected with other parasites, including those presenting monoinfections: hookworm ($n=4$); *Ascaris lumbricoides* ($n=2$); *Enterobius vermicularis* ($n=1$); *Giardia intestinalis* ($n=3$); *Hymenolepis nana* ($n=1$); *Schistosoma mansoni* ($n=9$); and those exhibiting polyinfections: hookworm, *H. nana* ($n=1$); *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp., *Endolimax nana* ($n=1$); *G. intestinalis*, *E. nana* ($n=1$); *A. lumbricoides*, *Blastocystis* spp. ($n=1$); *E. nana*, *S. mansoni*, *Blastocystis* spp. ($n=1$); hookworm, *E. coli*, *Entamoeba dispar/histolytica*; *S. mansoni* ($n=1$). Stool samples from all individuals were analysed by: (1) spontaneous sedimentation, (2) modified Baermann (Garcia, 2001) and (3) the agar plate culture (Koga *et al.* 1991) techniques. Briefly, the spontaneous sedimentation method is based on sedimentation of fecal material using a cup, after homogenization in water followed by filtration. The modified Baermann technique relies on the positive thermotaxis and hydrotaxis of the larvae; however, it employs a sedimentation cup containing heated water. The study received approval from the Research Ethics Committee of 'Universidade de São Paulo', state of São Paulo, Brazil (Protocol 266-046).

Parasites

Strongyloides venezuelensis filariform larvae were obtained from the feces of experimentally infected *Rattus norvegicus*. Stool samples were collected and homogenized with charcoal and water followed by incubation at 28 °C for 3 days. After this procedure, the larvae were recovered according to the modified Baermann method (Garcia, 2001).

Antigenic fractions

Approximately 200 000 filariform larvae of *S. venezuelensis* were resuspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.2) or Tris-HCl (25 mM, pH 7.5), containing 1× protease

inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). These were sonicated using five cycles of 20 s pulse each, on ice. The larval suspensions were centrifuged at 12 400 *g* for 30 min at 4 °C and the supernatant was collected as the soluble fraction (SS and TS in PBS, Tris-HCl, respectively). SS was then resuspended in 1% SDS, boiled for 5 min (100 °C), centrifuged at 12 400 *g* for 30 min at 4 °C and the supernatant was collected (membrane fraction SM). TS pellets were resuspended in 5 M urea, 2 M thiourea and 4% 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) followed by homogenization on ice for 30 min, centrifugation at 12 400 *g* for 30 min at 4 °C and collection of the supernatant (membrane fraction TM). All fractions were subjected to protein assays according to the method described by Lowry *et al.* (1951).

Electrophoresis and electrophoretic transfer

Analysis of antigenic fractions by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as described by Laemmli (1970), with some modifications. Briefly, 140 µg of each antigenic fraction was subjected to SDS-PAGE, using a 12% gel. The samples were resuspended in buffer (2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 50 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 0.01% bromophenol blue) and heated at 100 °C in a water bath for 5 min. The samples were then loaded on the gel immersed in buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 3.5 mM SDS) and subjected to electrophoresis at 40 mA and 100 V for approximately 2 h.

Immediately after electrophoresis, the proteins on the gel were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.2 µm) (Headquarter Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in a Mini Trans-blott system using the transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% ethanol, 0.69 mM SDS) at 200 mA and 50 V for approximately 2 h. The membranes were cut into strips of approximately 3 mm and stored until required.

Western blotting

After blocking for an hour in Tris-HCl buffer (1 M, pH 7.5) with 3% Tween-20 and 3% milk, the membrane was washed three times for 5 min in 10 mM Tris-HCl, and then incubated with test sera diluted 1:100 in T buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% skimmed milk powder) for 18 h at 4 °C. The secondary antibody (anti-human IgG Fc conjugated with peroxidase, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was then diluted 1:1000 in T buffer and added to the membrane. The binding was detected using DAB substrate (Sigma-Aldrich) in the dark. The antigenic components were then detected by Luminescent

image analyser scanner (Fujifilm, Minato, Tokyo, Japan) and Image Quant LAS 400 version 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA). The positivity of the immunogenic bands was determined based on the studies by Silva *et al.* (2003) and Feliciano *et al.* (2010). A cut-off higher than 50% positivity was established to evaluate the bands recognized more frequently by the sera of group I patients, in the four antigenic preparations.

Protein analysis by mass spectrometry

The bands showing the strongest recognition by the sera of infected patients were excised from the gel and immersed in fixative solution until completely destained. After washing in ultrapure water, the bands were digested with trypsin solution, diluted in ammonium bicarbonate (40 mM), for 20 min, followed by incubation for 12 h at 37 °C in ammonium bicarbonate (20 mM). After peptide purification, mass spectrometric experiments were performed on the Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA) instrument.

Mass spectral files were subjected to database searching using SequestHT algorithm underpinned by the Proteome Discoverer software (version 1.4, Thermo Scientific®). The area detector of precursor ions was chosen for quantification by a label-free approach. Search parameters included: (i) enzyme: trypsin/P; (ii) number of missed cleavage sites = 2; (iii) carbamidomethylation, as a static modification; (iv) oxidation of methionine N-terminal and acetylation, as dynamic changes; and (v) a mass tolerance of 10 ppm for parent ions and 0.1 Da for fragments. The *Strongyloides* protein database available at the UniProt server (www.uniprot.org) containing 12 544 sequences was used for the searches. A protein was considered to be accurately identified, at 1% false discovery rate, when two or more peptides were found.

RESULTS

The SDS-PAGE electrophoretic profile of different antigenic fractions revealed similarity in protein migration with molecular masses ranging from 15 to 150 kDa. Nevertheless, distinct protein bands in each lane could be observed by comparing soluble and membrane fractions, attesting for their differential composition.

In this study, protein bands exhibiting different antigenic components were recognized by the sera of patients in group I. Anyhow, we considered as immunodominants only those with a frequency of greater than 50% recognition. Positivity of WB technique was determined when the sample presented with two or more immunodominant bands. IgG antibodies present in the sera recognized 11 separate protein bands present in the soluble and membrane

antigenic fractions (Table 1). The band at 35–40 kDa was the only one present in all antigenic fractions. Bands of 14–15 kDa were identified in most antigenic fractions, followed by bands of 100–110 kDa. Cross-reactivity in group II was observed in individuals infected with *S. mansoni*, hookworms, and *A. lumbricoides*.

Upon observing the strongest recognition of the 30–40 kDa band, the band was excised and subjected to mass spectrometry (Fig. 1), followed by database searching for protein identification. The identities of the proteins and their abundance are shown in Table 2. The immunoreactive proteins that were identified in the soluble fractions, which exhibited the highest values of abundance, corresponded to metabolic enzymes (i.e. glutamine synthetase/guanido kinase and malate dehydrogenase). In addition, cytoskeletal constituents (i.e. actin and myosin heavy chain) and galectins were also identified as more abundant proteins in the membrane fraction.

DISCUSSION

The use of heterologous antigens from *S. ratti* or *S. venezuelensis* applied to immunodiagnosis constitutes a common practice in research laboratories, particularly in Brazil (Silva *et al.* 2003; Rigo *et al.* 2008; Gonzaga *et al.* 2011). Indeed, *S. ratti* larval extracts are employed routinely as they constitute the basis for the ELISA kits commercially available for the immunodiagnosis of strongyloidiasis (Anderson *et al.* 2014; Bisoffi *et al.* 2014). In this context, this study is the first to evaluate different antigenic fractions from *S. venezuelensis* filariform larvae using a proteomics approach for the serological diagnosis of human strongyloidiasis.

Although the WB technique is considered of high specificity, there are few studies in the literature on its application to serological diagnosis of human strongyloidiasis using homologous (Sato *et al.* 1990; Conway *et al.* 1993; Siddiqui *et al.* 1997) or heterologous antigens (Silva *et al.* 2003; Feliciano *et al.* 2010; Gonzaga *et al.* 2011). Here we intended to explore this technique further to identify potential protein markers for diagnosis of human strongyloidiasis.

The pattern of protein bands seen on the SDS-PAGE for the different antigenic fractions of *S. venezuelensis* larvae revealed the integrity of our preparations, with proteins exhibiting molecular masses within the full range 12–190 kDa. Similar profiles have been reported by Feliciano *et al.* (2010) and Gonzaga *et al.* (2011) in the analysis of saline soluble antigens. In the present paper, we present a novel soluble protein extract made in Tris-HCl buffer. The remaining insolubilized material, composed mostly of membrane fractions, had its protein extracted in a highly denaturing

Table 1. Reactive frequency of serum samples in WB using soluble (SS and TS) and membrane (SM and TM) fractions of *Strongyloides venezuelensis*

kDa	Soluble fractions				Membrane fractions			
	SS		TS		SM		TM	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
190	13/20							
110–100	13/20		16/20		14/20	2/26	16/20	3/26
71–66					15/20	3/26		
60–58	13/20							
53–49			17/20	1/26			16/20	1/26
40–35	16/20		20/20		19/20	9/26	18/20	3/26
29–28			14/20				10/20	
23–20	10/20	2/26	18/20		13/20	3/26	13/20	1/26
15	14/20	1/26	17/20		17/20	5/26	19/20	2/26
12					16/20		16/20

Fig. 1. WB and SDS-PAGE of soluble (SS and TS) and membrane (SM and TM) fractions of *S. venezuelensis* filariform larvae. WB of SS, TS, SM, and TM fractions, using serum samples of Groups I (G1) and II (G2). Polycrylamide gel after SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue is shown to indicate the excised regions (~30–40 kDa) of the antigenic fraction, by the dotted lines.

solution. These two fractions were used for the WB experiments. The presence of specific proteins in the membranes and excretory–secretory products of infective *S. stercoralis* larvae was described by Brindley *et al.* (1988) and Northern and Grove (1990). According to Zhan *et al.* (2015) nematode

membrane-associated antigens are exposed to the host's immune system and could therefore represent good immunodiagnostic targets. Recently, our research group emphasized the importance of membrane fractions from both the filariform larvae and the female parasite of *S. venezuelensis* for

Table 2. Proteins identified from soluble (SS and TS) and membrane (SM and TM) fractions of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. For this study, the Strongyloides database available in UniProt (www.uniprot.org) was used, and proteins that showed at least two different peptides with a confidence interval of above 95% were considered as identified

Fractions	Accession	Description	Score	Coverage	No. of unique peptides	MW (kDa)	Abundance (%) ^a
SSL							
30 kDa	A0A090L6V9	Actin*	88.75	46.81	9	41.8	15.1
	A0A090KYR4	Glutamine synthetase/guanido kinase	52.77	40.67	8	40.3	9.9
40 kDa	A0A090LL35	Aspartate aminotransferase	71.11	38.76	9	46.5	6.8
	A0A090KYR4	Glutamine synthetase/guanido kinase	100.07	34.26	8	40.3	41.0
	A0A090LDK1	Fructose-bisphosphate aldolase	73.76	41.21	9	39.5	19.9
	A0A090L6V9	Actin	90.34	30.32	2	41.8	16.1
STL							
30 kDa	A0A090L6V9	Actin*	202.67	49.47	2	41.8	68.3
	A0A090KPU4	Galectin	10.18	12.23	3	31.4	3.9
	A0A090KYR4	Glutamine synthetase/guanido kinase	26.59	23.96	7	40.3	3.1
40 kDa	A0A090L6V9	Actin	153.29	29.79	9	41.8	48.3
	A0A090LDK1	Fructose-bisphosphate aldolase	91.77	43.68	10	39.5	13.2
	A0A090KYR4	Glutamine synthetase/guanido kinase	62.31	22.84	6	40.3	12.9
MSL							
30 kDa	A0A090LNQ1	Myosin heavy chain*	148.08	20.66	33	227.2	37.2
	A0A090L6V9	Actin	95.74	38.83	19	41.8	10.2
	A0A090LDR7	ATP synthase subunit beta	95.23	35.59	15	57.0	6.5
40 kDa	A0A090L6V9	Actin	96.84	35.37	11	41.8	32.4
	A0A090MX65	Tropomyosin family	66.33	36.01	14	39.1	8.1
	A0A090LLS9	Immunoglobulin subtype 2 domain	35.37	30.67	10	36.3	6.5
MTL							
30 kDa	A0A090KPU4	Galectin*	12.80	14.03	2	31.4	29.0
	A0A090MMP9	Galectin	22.97	24.10	4	31.9	24.5
	A0A090L6V9	Actin	55.84	33.24	9	41.8	10.1
40 kDa	A0A090L6V9	Actin*	116.81	46.81	12	41.8	36.1
	A0A090TL1	Lamin Tail Domain domain	52.34	22.60	14	67.4	6.7
	A0A090KTV2	Galectin	19.92	14.10	4	35.4	6.3

*Mostly abundant component.

immunodiagnosis of strongyloidiasis by ELISA [Corral *et al.* (2015)].

In this study, the fractions analysed by WB showed great diversity of antigenic components, especially in the membrane fractions. Of the bands identified as immunogenic, the 35–40 kDa fraction was more frequently observed in all preparations. Similar results have been reported in several studies independently of which extraction methods were used for recovery of the antigenic fractions (Conway *et al.* 1993; Ravi *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2004; Sudre *et al.* 2007; Feliciano *et al.* 2010). Similar to the bands of 45 kDa reported by Machado *et al.* (2008) and 28–35 kDa by Gonzaga *et al.* (2011), using *S. venezuelensis* antigens, the same fractions were also reported as immunogenic by Silva *et al.* (2003) using *S. ratti* antigens, and a 41 kDa fraction reported by Siddiqui *et al.* (1997) using the homologous antigen. The fractions described in this study are probably equivalent to those identified by these authors, since minor

technical variations can result in distinct electrophoretic migration patterns.

The band at 35–40 kDa showed good sensitivity, ranging from 80 to 100% in the soluble fraction and 90 to 95% in the membrane fractions. However, this band was recognized by the sera of individuals infected with *S. mansoni*, hookworms, *H. nana*, *Giardia lamblia* and polyinfected patients; although cross-reactivities were not expected within this group of individuals. Three proteins of *S. stercoralis* filariform larvae identified in protein bands at 41, 31 and 28 kDa and particularly recognized by serum IgG from individuals with strongyloidiasis have been reported by Conway *et al.* (1993).

Bands of 23 and 15 kDa were present in four antigenic fractions, but with lower sensitivity compared with the 35–40 kDa band. Interestingly, some studies show varying recognition values among protein bands identified as immunogenic, most likely because they use different *Strongyloides* species as the antigen source (Silva *et al.* 2003;

Rodrigues *et al.* 2004; Sudre *et al.* 2007). Several bands recognized by antibodies present in serum samples from strongyloidiasis patients have been mentioned in different studies (Silva *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004; Sudre *et al.* 2007; Feliciano *et al.* 2010; Gonzaga *et al.* 2011), but these proteins have not been identified. In an attempt to better characterize the proteins recognized by most sera of group I individuals, mass spectrometry was performed.

These results showed that the soluble extracts contained a large number of proteins related to the parasite metabolism. Moreover, the membrane extracts revealed a number of structural proteins. In the excised band, a large abundance of actin was observed independently of the extraction procedure. Actin is one of the most abundant proteins found in eukaryotic cells and is highly conserved throughout evolution. It participates in many important cellular functions, including muscle contraction, cell motility, cell division, cytokinesis, vesicle and organelle movement, cell signalling, and the establishment and maintenance of cell junctions and cell shape (Fornelio *et al.* 1995; Pollard and Borisy, 2003; Bahia *et al.* 2006). Nematode cytoskeletal proteins, such as actin, can induce antibody production in the host. Actin is recognized by the host's immune system in human toxocariasis (Zhan *et al.* 2015) and is described in *Haemonchus contortus* infection (Yan *et al.* 2010). Recently, Yan *et al.* (2014) showed that a recombinant *H. contortus* actin DNA vaccine induced a partial immune response resulting in protective potential against goat haemonchosis. Actin was first observed in the vulva of the female *S. venezuelensis* using confocal microscopy (Silva *et al.* 2013). The high abundance of actin in the extract of *S. stercoralis* L3 larvae was demonstrated by Marcilla *et al.* (2010). However, the ability of actin to activate the immune system in strongyloidiasis remains to be evaluated.

Galectin was identified especially in the Tris-HCl buffer preparations. Galectins constitute a family of proteins involved in mediating immune recognition and host response modulation (Vasta, 2009). Galectin was identified in a proteomic study of *S. stercoralis* L3 larvae (Marcilla *et al.* 2010). Genes coding for galectins have been identified in parasitic nematode species, including *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Newton *et al.* 1997; Greenhalgh *et al.* 2000; Kiel *et al.* 2007). Galectin was identified as immunoreactive in *T. colubriformis* (Kiel *et al.* 2007). The functions of nematode galectins are not well understood, although they are believed to be important for parasite survival and host interaction (Young and Meeusen, 2004).

The strong immunoreactivity observed for galectin could be explained by the number of putative immunogenic peptides it contains. As for actin, given that it is an evolutionarily conserved protein, its

diagnostic value seems less promising. Thus, the identification of actin and galectin in the 30–40 kDa mass range represents promising results for further investigation. Other studies including more reference serum samples, encompassing wider range of helminthiasis, are therefore required to confirm the present findings. The results of this study represent the first step towards the identification of *S. venezuelensis* antigens to be explored for immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the patients who participated in the study, and also the Laboratory staff.

FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant no. FAPESP 2013/04236-9), Brazil (to R. C. B. G.).

REFERENCES

- Anderson, N.W., Klein, D.M., Dornink, S.M., Jespersen, D.J., Kubofcik, J., Nutman, T.B., Merrigan, S.D., Couturier, M.R. and Theel, E.S. (2014). Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 21, 732–736.
- Bahia, D., Avellar, L.G., Vigorosi, F., Goli, D., Oliveira, G.C. and Mortara, R.A. (2006). The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology* 133(Pt 3), 321–329.
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Krolewiecki, A.J., Albionico, M., Gobbo, M., Bonafini, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Muñoz, J. and Nutman, T.B. (2014). Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2640.
- Brindley, P.J., Gam, A.A., Pearce, E.J., Polindexter, R.W. and New, F.A. (1988). Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 28, 171–180.
- Buonfrate, D., Formentini, F., Perandini, F. and Bisoffi, Z. (2015). Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 543–545.
- Conway, D.J., Bailey, J.W., Linto, J.F., Robinson, R.D., Bundy, D.A.P. and Bianco, A.E. (1993). Serum IgG reactivity with 41-kDa, 31-kDa, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *Journal of Infectious Diseases* 168, 784–787.
- Corral, M.A., Paula, F.M., Gottardi, M., Meisel, D.M.C.L., Castilho, V.L.P., Gonçalves, E.M.N., Chieffo, P.P. and Geysels, R.C.B. (2015). Immunodiagnosis of human strongyloidiasis: use of six different antigenic fractions from *Strongyloides venezuelensis* parasitic females. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 427–430.
- Feliciano, N.D., Gonzaga, H.T., Gonçalves-Pires, M.D.R., Ribeiro-Gonçalves, A.L., Rodrigues, R.M., Ueta, M.T. and Costa-Cruz, J.M. (2010). Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 67, 153–161.
- Fornelio, A.C., Gonzalez, A.J. and Caabeiro, F.H. (1995). Actin isoforms in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* 81, 700–702.
- Garcia, L.S. (2001). *Diagnostic Medical Parasitology*, 4th Edn. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gonzaga, H.T., Ribeiro, V.S., Feliciano, N.D., Manhani, M.N., Silva, D.A.O., Ueta, M.T. and Costa-Cruz, J.M. (2011). IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunology Letters* 139, 87–92.
- Greenhalgh, C.J., Loukas, A., Donald, D., Nikolaou, S. and Newton, S.E. (2000). A family of galectins from *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 107, 117–121.

- Hunt, V. L., Tsai, L. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Tracey, A., Cotton, J. A., Stanley, E. J., Beasley, H., Bennett, H. M., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., Quail, M. A., Randle, N., Xia, D., Bestig, N. W., Soblik, H., Ribeiro, D. M., Sanchez-Flores, A., Hayashi, T., Itoh, Y., Denver, D. R., Grant, W., Stoltzfus, J. D., Lok, J. R., Murayama, H., Wastling, J., Streit, A., Kikuchi, T., Vinay, M. and Berriman, M. (2016). The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. *Nature Genetics* **48**, 299–307.
- Kiel, M., Josh, P., Jones, A., Windon, H., Hunt, P. and Kongsuwan, K. (2007). Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *International Journal for Parasitology* **37**, 1419–1429.
- Koga, K., Kasuya, S., Khamboonruang, C., Sukhavit, K., Ieda, M., Takatsuka, N., Kita, K. and Ohtomo, H. (1991). A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **45**, 518–521.
- Lucemmi, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680.
- Levenhagen, M. A. and Costa-Cruz, J. M. (2014). Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Tropica* **135**, 33–43.
- Lindo, J. F., Conway, D. J., Atkins, N. S., Bianco, A. E., Robinson, R. D. and Bundy, D. A. (1994). Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 175–179.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- Machado, E. R., Facciofi, L. H., Costa-Cruz, J. M., Lourenco, E. V., Roque-Barreira, M. C., de Fatima Goncalves Pires, M. D. R. and Ueta, M. T. (2008). *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Experimental Parasitology* **119**, 7–14.
- Marcilla, A., Sotillo, J., Perez-Garcia, A., Igual-Adell, R., Luz Valero, M., Sanchez-Pino, M. M., Bernal, D., Munoz-Antoli, C., Trellis, M., Toledo, R. and Esteban, J. G. (2010). Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology* **137**, 1577–1583.
- Newton, S. E., Monti, J. R., Greenhalgh, C. J., Ashman, K. and McCusker, E. N. (1997). cDNA cloning of galectins from third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **86**, 143–153.
- Northern, C. and Grove, D. I. (1990). *Strongyloides stercoralis* antigenic analysis of infective larvae and adult worms. *International Journal for Parasitology* **20**, 381–387.
- Olson, A., van Lieshout, L., Marti, H., Fokderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J. J. and Magnussen, P. (2009). Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**, 967–972.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–65.
- Ravi, V., Ramachandran, S., Thompson, R. W., Anderson, J. F. and Neva, F. A. (2002). Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* **125**, 73–81.
- Requena-Mendes, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E. and Munoz, J. (2013). The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2002.
- Rigo, C. R., Lescano, S. Z., de Marchi, C. R. and Amato Neto, V. (2008). Evaluation of the humoral immune response to *Strongyloides venezuelensis* antigens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 648–653.
- Rodrigues, R. M., Sapelete, M. C., Silva, D. A. D., Cunha-Junior, J. P., Taketomi, E. A. and Costa-Cruz, J. M. (2004). *Strongyloides ratti* antigenic antibodies in immunoblotting the immunodiagnosis components recognized by IgE as an additional tool for improving in human strongyloidiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 89–93.
- Sato, Y., Inoue, F., Matsuyama, R. and Shiroma, Y. (1990). Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 403–406.
- Siddiqui, A. A., Koenig, N. M., Sincsky, M. and Berk, S. L. (1997). *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitology Research* **83**, 655–658.
- Silva, L. P., Barcelo, I. S. D., Passos-Lima, A. B., Espindola, F. S., Campos, D. M. B. and Costa-Cruz, J. M. (2003). Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 687–691.
- Silva, C. V., Gonçalves, A. L., Cruz, L., Cruz, M. C., Ueta, M. T. and Costa-Cruz, J. M. (2013). F-actin accumulates in the vulva of female *Strongyloides venezuelensis*. *Journal of Helminthology* **87**, 301–304.
- Sudre, A. P., Siqueira, R. C., Barreto, M. G. M., Peralta, R. H. S., Macedo, H. W. and Peralta, J. M. (2007). Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitology Research* **101**, 1117–1123.
- Vasta, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 424–438.
- Yan, F., Xu, L., Liu, L., Yan, R., Song, X. and Li, X. (2010). Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *Veterinary Journal* **185**, 174–179.
- Yan, R., Wang, J., Xu, L., Song, X. and Li, X. (2014). DNA vaccine encoding *Haemonchus contortus* Actin induces partial protection in Goats. *Acta Parasitologica* **59**, 698–709.
- Young, A. R. and Moeuven, E. N. (2004). Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycobiology Journal* **19**, 601–606.
- Zhan, B., Ajmera, R., Geiger, S. M., Goncalves, M. T. P., Liu, Z., Wei, J., Wilkins, P. P., Fujiwara, R., Guzzini-Quimaraes, P. H., Bottazzi, M. B. and Hotez, P. (2015). Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. *Tropical Medicine and International Health* **20**, 1787–1796.

Apêndice E – Artigo submetido para publicação

Manuscript Details

Manuscript number	ACTROP_2018_323
Title	IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of <i>Strongyloides venezuelensis</i> in immunocompromised patients
Article type	Research Paper

Abstract

Immunosuppressed patients constitute a risk group for the development of severe clinical forms of human strongyloidiasis. The diagnosis of this infection is primarily performed by parasitological techniques, but with low sensitivity. Serological techniques appear as an alternative, especially with heterologous antigens use. The aim of this study was to perform the Western blotting technique by using *S. venezuelensis* filaroid larvae soluble (TS) and membrane (TM) saline antigens to reveal immunoreactive bands in immunocompromised patients with strongyloidiasis. Serum samples from 117 parasitologically well-characterized patients were divided into four groups: *S. stercoralis* positive and immunocompetent (S+IC); *S. stercoralis* positive and immunocompromised (S+IP); negative and immunocompetent (S-IC); negative and immunocompromised (S-IP). The 40-35KDa band was recognized by 100% of patients in the S+IC group in both antigenic fractions, and by 62.5% and 50% in the S+IP group using the TS and TM fractions, respectively. The 29KDa band was recognized by 86.3% and 72.7% (for TS and TM, respectively) of patients in the S+IC group, and only by 12.5% of patients in the S+IP group on the TM antigen. Regardless of the patients' immunological condition, the 40-35KDa band was detected more frequently and can be used as an important marker to the immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

Keywords	<i>Strongyloides venezuelensis</i> ; 40-35kDa band; Immunosuppressed patients.
Corresponding Author	Fabiana Martins de Paula
Corresponding Author's Institution	Laboratório de Investigação Médica HCFMUSP
Order of Authors	Marcelo Corral, Fabiana Martins de Paula, Dirce Meisel, Edson Abdala, sílvia costa, Lígia Pierroti, Juliana Yamashiro, Elenice Messias do Nascimento Gonçalves, Vera Castilho, Pedro Paulo Chieffi, Ronaldo Gryschek
Suggested reviewers	Ruben Mercado, Pedro Pinto, Idessania Nazareth Costa

Submission Files Included in this PDF**File Name [File Type]**

cover letter.docx [Cover Letter]

Corral et al., 2018.docx [Manuscript File]

Fig.1.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

1

São Paulo, March 16th, 2018.

Dear Prof. N.W. Brattig
Tropical Medicine Section, Bernhard Nocht Inst., Hamburg, Germany
Editor of *Acta Tropica*

We are submitting for appreciation and publication in *Acta Tropica* as Research Paper, the manuscript entitled "IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients".

All authors have made significant contributions to the design, analysis and writing of the study and accept responsibility for its contents. All of them approved this final version and agreed to submitted version of the Ms. We assume that the manuscript is original and there is no previous reports related to our work. The manuscript has not been published before and is not under consideration for publication elsewhere.

Sincerely yours,

Marcelo A. Corral

Fabiana Martins de Paula

Dirce M. C. L. Meisel

Edson Abdala

Silvia Figueiredo Costa

Ligia C. Pierrotti

Juliana Yamashiro

Elenice M. N. Gonçalves

Vera L. P. Castilho

Pedro Paulo Chieffi

Ronaldo C. B. Gryscek

*Corresponding author: Dra. Fabiana Martins de Paula. Laboratório de Investigação Médica - LIM/06. Prédio II Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil.
Tel: 55 11 3061-8220, e-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br

Research Paper

IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients

Marcelo Andreetta Corral^a, Fabiana Martins de Paula^{a,c,*}, Dirce Mary C. L. Meisel^a, Edson Abdala^b, Silvia Figueiredo Costa^b, Ligia Camera Pierrotti^b, Juliana Yamashiro^b, Elenice M. do Nascimento Gonçalves^d, Vera Lucia P. Castilho^d, Pedro Paulo Chieffi^e, Ronaldo Cesar B. Gryscek^{a,c}

^a *Laboratório de Investigação Médica (LIM/06 – Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, Brazil*

^b *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, Brazil*

^c *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil*

^d *Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, Brazil*

^e *Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa, São Paulo, Brazil*

* Address corresponding to Fabiana M Paula, Laboratório de Investigação Médica (LIM/06 – Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFM-USP), São Paulo, Brazil. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil. Phone: Tel.: +55 11 3061 8220. E-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br

ABSTRACT

Immunosuppressed patients constitute a risk group for the development of severe clinical forms of human strongyloidiasis. The diagnosis of this infection is primarily performed by parasitological techniques, but with low sensitivity. Serological techniques appear as an alternative, especially with heterologous antigens use. The aim of this study was to perform the Western blotting technique by using *S. venezuelensis* filaroid larvae soluble (TS) and membrane (TM) saline antigens to reveal immunoreactive bands in immunocompromised patients with strongyloidiasis. Serum samples from 117 parasitologically well-characterized patients were divided into four groups: *S. stercoralis* positive and immunocompetent (S+IC); *S. stercoralis* positive and immunocompromised (S+IP); negative and immunocompetent (S-IC); negative and immunocompromised (S-IP). The 40-35KDa band was recognized by 100% of patients in the S+IC group in both antigenic fractions, and by 62.5% and 50% in the S+IP group using the TS and TM fractions, respectively. The 29KDa band was recognized by 86.3% and 72.7% (for TS and TM, respectively) of patients in the S+IC group, and only by 12.5% of patients in the S+IP group on the TM antigen. Regardless of the patients' immunological condition, the 40-35KDa band was detected more frequently and can be used as an important marker to the immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*; 40-35kDa band; Immunosuppressed patients.

1. Introduction

Strongyloidiasis is a parasitic infection caused by a nematode *Strongyloides stercoralis*, with worldwide distribution, being particularly prevalent in tropical and subtropical regions (Requena-Méndez *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2015). It is an asymptomatic and chronic infection in most of cases. Some more severe cases can occur with hyperinfection and/or disseminated disease. The multiplicity of clinical presentations is related to host immunity; therefore several conditions could present a risk for the development of severe forms of this parasitism, such as alcoholism, diabetes mellitus with ketoacidosis, HTLV infection, candidates for organ transplants and corticosteroid therapy (Fardet *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2016; Guerreiro-Wooley *et al.*, 2017).

The definitive diagnosis of strongyloidiasis is based on faeces parasitological examination, especially when associated with parasite culture techniques, but with temporal limitations for getting a consistent result (Uparanukraw *et al.*, 1999). Immunological techniques have been developed to improve the sensitivity and specificity of diagnostic methods for this helminthiasis (Grove, 1996; Olsen *et al.*, 2009). Serological diagnosis, through the detection of antibodies against larval antigens, seems promising (Levanhagen and Costa-Cruz, 2014). In this work, we have used the heterologous antigens from other *Strongyloides* species larvae, especially *Strongyloides venezuelensis* (Costa-Cruz *et al.*, 2003; Corral *et al.*, 2015; Bosqui *et al.*, 2015).

Among the serological techniques, the ELISA test stands out, being widely studied and mainly used by several antigenic variations reported in the literature with appreciable sensitivity (Inês *et al.*, 2013, Corral *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2017; Arifin *et al.*, 2018). On the other hand, Western blotting (WB) technique has been used as an

important tool in the identification of immunogenic proteins when associated with proteomic techniques (Rodpai *et al.*, 2016, 2017; Corral *et al.*, 2017). Aiming to identify proteins for diagnostic purposes, the present study aims to use the WB technique from *S. venezuelensis* antigens to evaluate the presence of immunoreactive bands in immunosuppressed patients

2. Material and Methods

2.1 Serum samples

The study received approval from the Research Ethics Committee of Universidade de São Paulo, state of São Paulo, Brazil (protocol 266.046). Serum samples from immunocompetent and immunocompromised individuals obtained at the Hospital das Clínicas from Universidade de São Paulo, State of São Paulo, Brazil, were analyzed and divided into four groups:

- *S. stercoralis* positive immunocompetent (S+IC): 22 serum samples from immunocompetent individuals with a positive parasitological diagnostic for strongyloidiasis;
- *S. stercoralis* positive immunocompromised (S+IP): 32 serum samples from immunocompromised individuals with a positive parasitological diagnostic for strongyloidiasis (Organ Candidate transplantation, HIV+, HTLV+, Kidney Post Transplantation and cancer);
- *S. stercoralis* negative immunocompetent (S-IC): 36 serum samples from healthy individuals;

- *S. stercoralis* negative immunocompromised (S-IP): 27 serum samples from immunocompromised individuals with a negative parasitological diagnostic for intestinal parasites (Organ Candidate transplantation, HIV+ and HTLV+).

2.2 Parasites

Larvae of *S. venezuelensis* were obtained from charcoal cultures of feces of *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected (approval CPE-IMT 2011/126). The cultures were stored for 48h at 28 °C and the infective larvae were collected and concentrated using modified Baerman's method (Garcia, 2001).

2.3 Antigenic Fractions

Two antigenic fractions, soluble and membrane, were prepared. Approximately 400,000 *S. venezuelensis* filariform larvae (L3), were added Tris-HCl (pH 7.5) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and disrupted in an ice bath using a tissue homogenizer with 5 cycles of 20 pulses. The suspensions were centrifuged at 12,400g for 30 minutes at 4° C and the supernatant was collected (soluble fractions, TS). Pellets were resuspended in 7 M urea, 2 M thiourea, and 2% CHAPS ([3-cholamidopropyl]dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate); followed by homogenization on ice for 30 minutes, centrifugation at 12,400 x g for 30 minutes at 4°C, and collection of the supernatant (membrane fraction, TM). The protein was quantified and stored at -20° C until use.

2.4 SDS-PAGE and Western-Blotting (WB)

To SDS PAGE (SCIE-PLAS, LTD, Cambridge, EN), 140µg of each antigenic fraction was subjected using a 12% gel. The samples were resuspended in buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.1M DTT, 0.2% bromophenol blue) and

heated at 100° for five minutes and proceeded to electrophoresis at 40mA and 100V. Immediately after electrophoresis, the proteins on the gel were transferred to PVDF membranes (0.2µm) (Headquarter Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in Mini Trans-blot system using the buffer (10mM Tris Glycine 95mm , 20% ethanol, 10% SDS) at 200mA e 50V. The membranes were cut into strips of approximately 3 mm and stored until the moment of use.

For WB, membranes were blocking for an hour in Tris-HCl buffer 1M pH 7.5 plus 3% Tween20 and 3% milk, washed 3x for 5 minutes in 10mM Tris-HCl buffer) and incubated with the diluted test sera 1: 100 in TM buffer (1M Tris-HCl pH 7.5 5% 2% 5 M NaCl plus 0.05% Tween 20 and 5% skimmed milk powder) for 18 hours at 4 °C. Then, the secondary antibody (anti-human IgG Fc conjugated with peroxidase fraction, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added diluted 1: 1000 in TM buffer by 1:30 a.m. The revelation was performed with DAB with metal enhancer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The antigenic components were detected by the scanner Luminescent image analyzer (Fujifilm, Minato, Tokyo, Japan) and the program VisionWorks, version 8, Analysis Software (DBA Analytik Jena, Germany).

2.5 Statistical analysis

Results of the Western-blotting testing were analyzed by the Fisher test comparing immunocompetent and immunocompromised groups. A p value <0.05 was considered as statistically significant in all the cases.

3. Results

IgG antibodies present in sera of positive patients S+IC have recognized six different protein bands (110-100, 53-49, 40-35, 29, 23 e 15KDa) in soluble and membrane

antigenic fractions (Table 1). The 40-35KDa band were recognized by 100% of S+IC patients in both antigenic fractions.

At the S+IP group, 68.8% (22/32) recognized at least one immunogenic band in TS fraction (Table 1). The recognition of 40-35kDa band occurred in almost all samples of this group, with the exception of one that recognized exclusively the 110-100KDa band and another 53-49KDa. At the TM fraction, 53.1% (17/32) of patients recognized immunogenic bands, all of them recognized the 40-35KDa band.

The 40-35KDa was the only band present in both antigenic fractions by S+IC group and the most frequent in S+IP group (62.5% and 53.1%, respectively for TS and TM) ($p < 0.0001$) when compared with S-IC and S-IP groups. The 29KDa band was recognized by 86.3% and 72.7% of serum samples from the S+IC group using TS and TM antigenic fractions, respectively. In the S+IP group, only 12.5% recognized it in TM fraction.

There was a greater marking intensity of the protein bands in the patients' strips at the S+IC group than in the S+IP group, but the 40-35kDa band was easily visualized independent of the antigenic fractions (Figure 1).

4. Discussion

WB technique has been used in the immunodiagnosis of strongyloidiasis, with high specificity and sensitivity in the recognition of antigenic components from *S. stercoralis* or heterologous antigens by antibodies present in the serum of patients with strongyloidiasis (Conway *et al.*, 1994; Silva *et al.* 2003). However, it is still less explored compared to ELISA, since it is a technique that involves many steps such as SDS-PAGE beside the electrotransference of proteins and the WB reaction itself. This demonstrates

the need for greater standardization of serological techniques, especially in the selection of the antigen fraction extraction method, as well as the interpretation of the results. It is important to note that this work is a pioneer in the evaluation of protein bands recognition using heterologous antigen for the serological diagnosis of strongyloidiasis in samples from immunocompromised patients harboring *S. stercoralis* larvae.

The 40-35KDa band was recognized by specific IgG antibodies present in serum samples from all individuals in the S+IC group. This data agrees with the literature, in which the band of 45 KDa (Machado *et al.*, 2008), 35-28KDa (Gonzaga *et al.*, 2011) and 40-35KDa (Corral *et al.*, 2017) were the most recognized in the parasitologically defined serum samples from positive for *S. stercoralis* immunocompetent patients, independent of the *S. venezuelensis* antigen preparation. This same band was also demonstrated by Silva *et al.*, (2003) using *Strongyloides ratti* antigen. Besides that, Siddiqui *et al.* (1997) identified the 41KDa band as immunogenic, employing homologous antigen.

It is important to note that there was a greater frequency of recognition of the 40-35kDa band in patients in the S+IP (62.5% and 53.1%, for TS and TM, respectively). In addition, of the patients in the S+IP group who showed some recognition, 91.9% and 100% using the TS and TM fractions, respectively, also recognized the 40-35KDa band. The present results demonstrate the diagnostic importance of the 40-35kDa band, even with lower recognition intensity in the samples of S+IP patients, a fact that was already expected, since immunocompromised individuals may have an ineffective humoral response with low titers of immunoglobulins in the blood, against parasitic infections (Silva *et al.*, 2014).

The proteins present in the 40-35KDa band were identified by proteomic techniques, and galectin was found in this region, which reinforces the importance of

proteins with this molecular mass (Rodpai *et al.*, 2017; Corral *et al.*, 2017). On the other hand, the recognition of this band by serum samples from negative patients may be due to the presence of other immunogenic proteins in this region, such as actin, previously described by our group (Corral *et al.*, 2017).

The 29KDa band was recognized by 19 (86.3%) and 17 (72.7%) of the S+IC group in the antigenic fractions TS and TM, respectively. However, this band was recognized by only 12.5% of serum samples from patients of the S+IP group in the antigenic fraction TM. 29KDa band was identified as immunogenic using the *S. stercoralis* antigen and sequenced by Rodpai *et al.*, (2016). However, data from the present study demonstrate the highest recognition of this band by immunocompetent patients.

Regardless of the immunological condition of the patients, the 40-35KDa band was observed more frequently. Thus, the recognition of this band by Western blotting technique may appear as an important alternative to the diagnosis of human strongyloidiasis, especially in immunocompromised patients.

Acknowledgements

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/51110-2 and 2013/04236-9).

Conflict of Interests

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

References

- Arifin, N., Yunus, M.H., Nolan, T.J., Lok, J.B., Noordin, R., 2018. Identification and Preliminary Evaluation of a Novel Recombinant Protein for Serodiagnosis of Strongyloidiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press)
- Batista, M.V., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Clemente, W.T., Girão, E.S., Rosa, D.R., Ianhez, L.E., Bonazzi, P.R., Lima, A.S., Fernandes, P.F., Pádua-Neto, M.V., Bacchella, T., Oliveira, A.P., Viana, C.F., Ferreira, M.S., Shikanai-Yasuda, M.A., 2011. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop. Med. Int. Health.* 16, 1134-1142.
- Bosqui, L.R., Gonçalves, A.L., Gonçalves-Pires, M.do R., Custodio, L.A., de Menezes, M.C., Murad, V.A., de Paula, F.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., Costa-Cruz, J.M., Costa, I.N., 2015. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Trop.* 150, 190-195.
- Conway, D.J., Bailey, J.W., Lindo, J.F., Robinson, R.D., Bundy, D.A., Bianco, A.E., 1993. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *J. Infect. Dis.* 168, 784-787.
- Corral, M.A., Paula, F.M., Gottardi, M., Meisel, D.M.C.L., Chieffi, P.P., Gryscek, R.C.B., 2015. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* for using in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 57, 77-80.

- Corral, M.A., Paula, F.M., Meisel, D.M., Castilho, V.L., Gonçalves, E.M., Levy, D., Bydlowski, S.P., Chieffi, P.P., Castro-Borges, W., Gryscek, R.C., 2017. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology*. 144, 124-130.
- Costa-Cruz, J.M., Madalena, J., Silva, D.A.O., Sopelete, M.C., Campos, D.M.B., Taketomi, E.A., 2003. Heterologous antigen extract in the ELISA for the detections of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo*. 45(5), 265-268.
- Cunha, R.A., de Carvalho, E.F.G., de Sousa, J.E.N., Costa-Cruz, J.M., 2017. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. *Parasitol Int*. 66(5), 671-676
- Fardet, L., Génèreau, T., Cabane, J., Kettaneh, A., 2006. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients. *Clin Microbiol Infect*. 12(10), 945-947.
- Garcia, L.S., 2001. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Gonzaga, H.T., Ribeiro, V.S., Feliciano, N.D., Manhani, M.N., Silva, D.A., Ueta, M.T., Costa-Cruz, J.M., 2011. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunol. Lett*. 30, 87-92.
- Grove, D.I., 1996. Human strongyloidiasis. *Adv. Parasitol.*, 38, 251-309.
- Guerrero-Wooley, R., Aranda-Aguirre, E., Li, W., Wilkin, A., Palavecino, E. 2017. Case Report: *Strongyloides stercoralis* Hyperinfection in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 97(5), 1629-1631

- Inês, E. d. J., Sampaio Silva, M. L., Souza, J. N., Aquino Teixeira, M. C., Soares, N. M., 2013. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 31-35.
- Levenhagen, M.A., Costa-Cruz, J.M., 2014. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop.* 135, 33-43.
- Machado, E. R., Faccioli, L. H., Costa-Cruz, J. M., Lourenco, E. V., Roque-Barreira, M.C., Goncalves-Pires, M.d.R.F., Ueta, M.T., 2008. *Strongyloides venezuelensis*: The antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Exp. Parasitol.* 119, 7-14.
- Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J.J., Magnussen, P., 2009. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 967-972.
- Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., Muñoz, J., 2013. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(e-2002):1-10.
- Rodpai, R., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Sanpool, O., Janwan, P., Laummaunwai, P., Wongkham, C., Insawang, T., Maleewong, W., 2016. *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol Res.* 2016.115(10), 4007-4012
- Rodpai, R., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Sanpool, O., Janwan, P., Laummaunwai, P., Wongkham, C., Insawang, T., Maleewong, W., 2017. Identification of antigenic

proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. Parasitol Res. 116(6),1687-1693.

Siddiqui, A.A., Koenig, N.M., Sinensky, M., Berk, S.L., 1997. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. Parasitol. Res. 83, 655-658.

Silva, L.P., Barcelos, I.S., Passos-Lima, A.B., Espindola, F.S., Campos, D.M., Costa-Cruz, J.M., 2003. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98, 687-691.

Silva, M.L., Inês, E.de J., Souza, A.B., Dias, V.M., Guimarães, C.M., Menezes, E.R., Barbosa, L.G., Alves, M.del C., Teixeira, M.C., Soares, N.M., 2016. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. Acta Trop. 154, 133-138

Teixeira, M.C., Pacheco, F.T., Souza, J.N., Silva, M.L., Inês, E.J., Soares, N.M., 2016. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. Biomed. Res. Int. 2016,4872473.

Toledo, R., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G., 2015. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. Adv, Parasitol. 88, 165-241.

Uparanukraw, P., Phongsri, S., Morakote, N., 1999. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 967-973.

Table 1

Reactivity frequency of serum samples from immunocompetent and immunocompromised patients in Western-blotting using soluble (TS) and membrane (TM) fractions of *S. venezuelensis* filarioid larvae.

KDa	Antigenic Fraction	S+IC n (%)	S+IP n (%)	S-IC n (%)	S-IP n (%)
110-100	TS	22 (100)	8 (25)	-	5 (18.5)
	TM	18 (81.8)	6 (18.8)	-	-
53-49	TS	22 (100)	5 (15.6)	-	6 (22.2)
	TM	13 (59.1)	6 (18.8)	-	-
40-35	TS	22 (100)	20 (62.5)	3 (8.3)	2 (7.4)
	TM	22 (100)	17 (53.1)	1 (2.8)	1 (3.7)
29	TS	19 (86.3)	-	2 (5.6)	1(3.7)
	TM	16 (72.7)	4 (12.5)	1 (2.8)	-
23	TS	4 (18.2)	2 (6.3)	1 (2.8)	3 (11.1)
	TM	13 (59.1)	1(3.2)	-	-
15	TS	4 (18.2)	-	2 (5.6)	-
	TM	12 (54.5)	3 (9.4)	3 (8.3)	-

S+IC (*S. stercoralis* positive immunocompetent); S+IP (*S. stercoralis* positive immunocompromised); S-IC (*S. stercoralis* negative immunocompetent) and S-IP (*S. stercoralis* negative immunocompromised).

S+IC: TS

S+IC: TM

S+IP: TS

S+IP: TM

Fig. 1. Positive Western-Blotting Positive Intensity in immunocompetent (S+IC) and immunocompromised (S+IP) positive patients, using soluble (TS) and membrane (TM) antigen fractions of filarioid larvae of *S. venezuelensis*, respectively.