Priscilla Duarte Marques Fonseca

**Análise proteômica dos estágios evolutivos de larva filarioide
e fêmea parasita de *Strongyloides venezuelensis***

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Priscilla Duarte Marques

Análise proteômica dos estágios de larva filarioide e fêmea parasita de
Strongyloides venezuelensis / Priscilla Duarte Marques Fonseca. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Fabiana Martins de Paula

Descritores: 1. ESTRONGILOIDÍASE. 2. PROTEÔMICA. 3. DIAGNÓSTICO. 4.
INFECÇÃO EXPERIMENTAL ANIMAL.

USP/IMTSP/BIB-19/2019.

Dedico ao grande amor da minha vida André
Lopes Fonseca e aos meus pais Patrícia de F. G. D.
Marques e Paulo da Silva Marques a quem devo tudo
o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a DEUS por tudo que me tem proporcionado, por todas as provas e desafios a mim impostos e pelos meus sucessos alcançados, pelas pessoas que ELE tem colocado em meu caminho que tanto me ajudam a seguir em frente e superar os obstáculos.

À Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula pesquisadora científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM/06, Imunopatologia da esquistossomose) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, desde já lhe agradeço pela dedicação e atenção em ser minha orientadora. Obrigada por me conduzir ao caminho da pesquisa e a ampliar meus horizontes.

A Profa. Dra. Suzana Angélica Zevallos Lescano pesquisadora científica do laboratório de Helminologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, obrigada pela orientação desde o Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, acompanhando meu desenvolvimento e me proporcionando oportunidades.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek que permitiu a minha permanência neste laboratório e por ter acreditado no meu trabalho, obrigada.

À Dra. Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo por compartilhar suas experiências profissionais e por ser sempre uma pessoa gentil e agradável.

A todos os Funcionários do Imunopatologia da esquistossomose do Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Dra. Dirce Mary Correia Lima pela disposição em contribuir nos experimentos e por ser uma pessoa dedicada,

preocupada, amorosa e atenciosa com todos. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e por sempre nos apoiar e nos ensinar.

À MSc Maria do Rosário Alexandre da Silva, por compartilharmos experiências, pelo convívio prazeroso no laboratório e amizade que certamente levarei para toda a vida.

Ao MSc. Willian H. Roldán Gonzáles pela amizade, companheirismo, sinceridade, respeito e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A Eliane Araújo, secretária do programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por ser uma excelente profissional, só tem a te agradecer por toda ajuda prestada.

Ao Dr. William de Castro Borges da Universidade de Ouro Preto, pela parceria na realização das técnicas deste trabalho.

Aos meus pais, Paulo da Silva Marques e Patrícia de F. G. D. Marques por me conceder um lar repleto de amor e me proporcionar toda a estrutura necessária para o meu desenvolvimento. Prometo sempre lhes dar orgulho.

Ao meu esposo e companheiro André Lopes Fonseca, por acreditar no meu potencial e no meu futuro promissor. Obrigada pelo total apoio nesta jornada e por me fazer sentir especial e amada todos os dias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP nº 2016/06158-0).

**“A persistência é o menor
caminho do êxito”.**

(Charles Chaplin)

RESUMO

Fonseca PDM. Análise proteômica dos estágios evolutivos de larva filarioide e fêmea parasita de *Strongyloides venezuelensis* (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

A estrongiloidíase é uma doença parasitária negligenciada causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*, geralmente assintomática, no entanto potencialmente fatal em indivíduos imunocomprometidos. Trata-se de uma infecção de difícil diagnóstico devido a pequena e irregular eliminação de larvas nas fezes. Espécies do gênero que infectam roedores, como *Strongyloides venezuelensis*, têm sido utilizadas para o estudo de aspectos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, e como alternativa para produção de antígenos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão diferencial de proteínas nos estágios evolutivos de larva filarioide (L3) e fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*, bem como utilizar o modelo experimental para verificar o reconhecimento de proteínas ao longo da infecção. A análise proteômica por *Shotgun* identificou um total de 1017 proteínas no extrato solúvel, considerando os dois estágios evolutivos, sendo 686 e 835 proteínas identificadas na L3 e na FP, respectivamente. Destas 56 proteínas foram diferencialmente expressas na L3 e 227 na FP. Das proteínas diferencialmente expressas na L3, pode-se observar uma grande quantidade de proteínas relacionadas com a atividade enzimática, algumas estruturais, além da galectina. Por outro lado, na FP foram identificadas proteínas relacionadas com a síntese proteica, com o processo de reprodução, e com a homeostase celular. Sabendo-se que o estágio de L3 de *S. venezuelensis* tem sido frequentemente utilizado como antígeno heterólogo foi realizada uma análise do seu conteúdo proteico total voltada para uma possível aplicação no contexto do imunodiagnóstico. Nesta abordagem, pode-se verificar que galectinas, catepsinas, metaloproteínases e proteína Zeta 14-3-3 possam fazer parte de um catálogo de possíveis alvos a serem explorados no diagnóstico da estrongiloidíase humana. E por fim, avaliou-se o reconhecimento de frações proteicas total e purificada (em coluna de α -Lactose) obtidas de L3 de *S. venezuelensis* por anticorpos IgG presentes em amostras de animais infectados experimentalmente. A fração purificada representou a fração de galectina, como confirmado por *Western-blotting* utilizando anticorpo anti-galectina. Pode-se observar que ocorreu um aumento na produção de anticorpos IgG ao longo da infecção experimental, considerando a fração total. Por outro lado, foi observado uma produção constante de anticorpos frente a fração purificada ao longo da infecção. Os presentes resultados confirmam a utilização de diferentes frações antigênicas no contexto do imunodiagnóstico da infecção experimental por *S. venezuelensis*. Além disso destaca que a fração de galectina obtida de L3 de *S. venezuelensis* pode ser produzida em grandes quantidades, o que pode facilitar sua aplicação no futuro no diagnóstico de estrongiloidíase humana.

Descritores: Estrongiloidíase. Proteômica. Diagnóstico. Infecção experimental animal.

ABSTRACT

Fonseca PDM. Proteomic analysis of the evolutionary stages of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae and parasite female (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Strongyloidiasis is a neglected parasitic disease caused by *Strongyloides stercoralis* nematode, it is generally asymptomatic, however potentially fatal in immunocompromised individuals. It is an infection difficult to diagnose due to the small and irregular elimination of larvae in the feces. Species of the genus that infects rodents such as *Strongyloides venezuelensis*, have been used to study aspects involved in host-parasite relation, and as an alternative for antigen production. This study aimed to evaluate the differential expression of proteins in the evolutionary stages of filariform larvae (L3) and female parasite (FP) *S. venezuelensis* as well as to use the experimental model to verify protein recognition during infection. Shotgun proteomics analyses identified a total of 1017 proteins in the soluble extract considering the two evolutionary stages, 686 and 835 proteins identified in L3 and FP, respectively. Of these 56 proteins were differentially expressed in L3 and 227 in PF. Of the differentially expressed proteins in L3, there is a large amount of proteins related to enzymatic activity, some structural, besides galectin. Nevertheless, in FP was identified proteins related to protein synthesis, reproduction process and cellular homeostasis were identified. Knowing that *S. venezuelensis* L3 stage has often been used as a heterologous antigen, an analysis of its total protein content aimed at possible application in the context of immunodiagnosis was performed. In this approach, it can be verified that galectins, cathepsins, metalloproteinases and Zeta 14-3-3 protein may be part of a catalog of possible targets to be explored in the diagnosis of human strongyloidiasis. Finally, the recognition of total and purified protein fractions (α -Lactose column) obtained from *S. venezuelensis* L3 by IgG antibodies present in samples of experimentally infected animals was evaluated. The purified fraction represented the galectin fraction as confirmed by Western blotting using anti-galectin antibody. It can be observed that there was an increase in IgG antibody production along the experimental infection, considering the unpurified fraction. Nevertheless, constant antibody production was observed against the purified fraction throughout the infection. The present results confirm the use of different antigenic fractions in the context of immunodiagnosis of experimental *S. venezuelensis* infection. Moreover, it is emphasized that the galectin fraction obtained from *S. venezuelensis* L3 can be produced in large quantities, which may facilitate its future application in the diagnosis of human strongyloidiasis.

Descriptors: Strongyloidiasis. Proteomic. Diagnosis. Animal experimental infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição mundial da Estrongiloidíase.....	03
Figura 2-	Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i>	06
Figura 3-	SDS-PAGE 12% do extrato solúvel de larvas filarioides (L3) e de fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i> .MM (Padrão de Massa Molecular)	31
Figura 4-	Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e de fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i> , segundo <i>Heatmap</i> . A expressão está em escala, onde o verde representa menor expressão e o vermelho maior expressão.....	35
Figura 5-	Reconhecimento de bandas antigênicas no extrato proteico de larvas filarioides (L3) de <i>S. venezuelensis</i> por soros de ratos infectados experimentalmente 7º 21º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.), e controle negativo (CN).....	47
Figura 6-	SDS-PAGE 12% do extrato de larvas filarioides (L3) de <i>S. venezuelensis</i> , submetida coluna de α -lactose fração não ligada (FNL) e ligada (FL), e <i>Western-blotting</i> utilizando anticorpo específico para galectina revelado por substrato quimioluminescente (WB).	48
Gráfico 1-	Classificação de acordo com o <i>Gene Ontology</i> das proteínas identificadas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i> , considerando nível 2.....	32
Gráfico 2-	Representação gráfica das proteínas diferencialmente expressas nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i> . Proteínas estão plotadas de acordo com os critérios de significância e abundância relativa.....	33
Gráfico 3-	Função molecular segundo o <i>Gene Ontology</i> das proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i>	34
Gráfico 4-	Distribuição de proteínas no extrato de larva infectante (L3) de <i>S. venezuelensis</i> . Frequência acumulada no extrato revelou que 82 constituintes contribuem para 50% da massa total.....	40
Gráfico 5-	Função molecular segundo o <i>Gene Ontology</i> das proteínas identificadas no extrato proteico de larva infectante (L3) de <i>S. venezuelensis</i>	41
Gráfico 6-	Domínio das proteínas não categorizadas no extrato de L3 de <i>S. venezuelensis</i> , consideradas positivas por <i>SignalP-TMHMM</i> ou ambas as análises, utilizando o Uniprot.....	45

Gráfico 7-	Cinética de ovos por grama de fezes (OPG) nas fezes dos animais individualizados infectados com <i>S. venezuelensis</i> nos diferentes dias pós- infecção (d.p.i.)	46
Gráfico 8-	Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro de animais individualizados infectados com <i>S. venezuelensis</i> por ELISA utilizando o extrato proteico de larva filarioide (A), fração ligada (B) e fração não ligada (C).....	49
Gráfico 9-	Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro de animais agrupados infectados com <i>S. venezuelensis</i> por ELISA utilizando o extrato proteico de larva filarioide (A), a fração ligada (B) e fração não ligada (C).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico de larva infectante (L3) de <i>S. venezuelensis</i> , identificadas na base de dados, agrupadas em categorias e localizadas de acordo com o Uniprot.....	37
Tabela 2-	Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico da fêmea parasita (FP) de <i>S. venezuelensis</i> , identificadas na base de dados, agrupadas em categorias e localizadas de acordo com o Uniprot.....	38
Tabela 3-	Proteínas identificadas no estágio de larva filarioide (L3) de <i>S. venezuelensis</i> segundo o critério do peptídeo sinal (<i>SignalP</i>) e domínio transmembrana (<i>THMM</i>).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
<i>ad libitum</i>	à vontade
APS	Persulfato de amônio
<i>BLAST</i>	Ferramenta básica de alinhamento local
BSA	Albumina de soro bovino
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
Cm	Centímetros
Cm ²	Centímetros quadrados
<i>Cut-off</i>	Frequência absoluta do corte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DPI	Dias pós infecção
DO	Densidade ótica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
E/S	Excreção/ Secreção
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FM/USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FNL	Fração não ligada
FL	Fração ligada
FP	Fêmea parasita
G	Gramma
<i>g</i>	Giros
FL	Galectina
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula T Humana
IAA	Iodoacetamida
IE	Índice ELISA
IEF	Isoeletrofocalização
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
kDa	Kilodaltons
L1	Larva rabditoides
L3	Larva filarioide infectante
L4	Larva filarioide de quarto estágio

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
m/z	Massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	<i>Ophenylenediamine</i> (o-fenilenodiamina)
OPG	Ovos por grama de fezes
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato- salino
PBS-T	Tampão fosfato- salino acrescido de <i>Tween20</i>
PBS-TM	Tampão fosfato- salino acrescido de <i>Tween20</i> e leite desnatado em pó
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	<i>Polyvinylidenedifluoride</i> (Fluoreto de Polivinilideno)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SL3	Extrato solúvel de larva filarióide
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (solução Cromogênica)
<i>Tween</i>	Polioxietilensorbitano-monolaurato
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V	Volts
v/v	Volume por volume
WB	<i>Western blotting</i>
WGO	Organização Mundial de Gastroenterologia
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Microgramas
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais	2
1.2 Epidemiologia da Estrongiloidíase.....	2
1.3 Aspectos biológicos de <i>S. stercoralis</i>	4
1.4 Resposta Imune do Hospedeiro.....	7
1.5 Manifestações clínicas da estrongiloidíase.....	8
1.6 Diagnóstico da Estrongiloidíase.....	10
1.7 Proteômica.....	15
1.8 Estrongiloidíase experimental.....	16
1.8.1 Aspectos biológicos de <i>S. venezuelensis</i>	16
1.8.2 <i>Rattus norvegicus</i> como modelo experimental.....	17
1.9 Justificativa.....	18
2 OBJETIVOS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Aspectos Éticos.....	20
3.2 Manutenção da cepa de <i>S. venezuelensis</i>	20
3.3 Infecção com <i>S. venezuelensis</i>	20
3.4 Obtenção das formas evolutivas de <i>S. venezuelensis</i>	21
3.4.1 Larvas filarioides (L3)	21
3.4.2 Fêmeas parasitas (FP).....	21
3.5 Produção dos extratos proteicos de <i>S. venezuelensis</i>	22
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das frações antigênicas.....	22
3.6.1 Eletroforese Unidimensional (1D)	23
3.7 Digestão trípica em solução.....	23
3.7.1 Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	24
3.7.2 Análise dos dados proteômicos.....	25
3.8 Delineamento da infecção experimental.....	26
3.8.1 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	26
3.9 Fração de Galectina (FL).....	27
3.9.1 <i>Western Blotting</i> (WB).....	28
3.9.2 <i>“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”</i>	29
3.10 Análises estatísticas.....	30
3.11 Normas de biossegurança.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Caracterizações dos extratos proteicos de L3 e de FP de <i>S. venezuelensis</i>	31
4.2 Análise proteômica.....	32
4.2.1 Análise quantitativa dos extratos proteicos de L3 e de FP de <i>S. venezuelensis</i>	32
4.2.2 Análise das proteínas identificadas na larva L3 de <i>S. venezuelensis</i> para fins de diagnóstico.....	39
4.2.3 Busca pelo <i>“SignalP”</i> e domínio transmembrana”	42
4.3 Infecção experimental.....	46
4.3.1 Cinética da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG).....	46
4.3.2 <i>Western- blotting</i> e ELISA.....	47
5 DISCUSSÃO.....	51
5.1 Análise quantitativa nos estágios de L3 e FP de <i>S. venezuelensis</i>	51
5.2 Análise quantitativa no estágio de L3 de <i>S. venezuelensis</i> para fins diagnósticos.....	55

5.3 Modelo experimental.....	61
6 CONCLUSÃO.....	66

1 INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase humana é uma infecção causada principalmente pelo nematodeo intestinal *Strongyloides stercoralis*, frequentemente encontrada em regiões com condições sanitárias precárias, especialmente em áreas de climas tropicais e subtropicais¹⁻³. Esta helmintíase é uma parasitose negligenciada no Brasil, com alto impacto em saúde pública⁴. A infecção ocasionada por *S. stercoralis*, na maioria dos casos é assintomática, no entanto pode evoluir para quadros severos, como uma hiperinfecção e doença disseminada com alta mortalidade, principalmente em pacientes imunodeprimidos⁵⁻⁷. Associado a isto, tem-se a inexistência de um método de diagnóstico sensível e específico para ser empregado. Diversos grupos demonstram que a sorologia pode ser uma alternativa complementar ao diagnóstico parasitológico^{8,9}.

Várias pesquisas apontam a utilização de modelo experimental, baseados na espécie de roedores, *S. rattí* e *S. venezuelensis*, para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na interação parasito-hospedeiro, além de possibilitar a avaliação de técnicas de diagnósticas, uma vez que se constitui uma importante fonte heteróloga de antígeno^{10,11}. Neste contexto estudos proteômicos constituem grandes possibilidades de avanços no conhecimento envolvendo o gênero *Strongyloides* sp. sobretudo na identificação de alvos potenciais para o diagnóstico sorológico na estrongiloidíase.

1.1 Aspectos gerais

Strongyloides stercoralis foi descrito pela primeira vez em 1876 por Louis Alexis Normand em fezes de soldados franceses com "diarréia da Conchinchina" (atual Vietnã)^{12,13}. No mesmo ano esse helminto foi denominado como *Anguillula intestinalis* por Arthur René Jean Baptiste Bavay. Em 1879, o gênero *Strongyloides* foi definido por Grassi, e em 1902, Stiles e Hassall denominaram como *Strongyloides stercoralis* ("*Strongylus*" = arredondado, "*oides*" = semelhantes e "*stercus*" = esterco), após observarem a presença de um ciclo de vida complexo, constituído por formas de vida livre e forma parasitária¹⁴.

Os nematódeos do gênero *Strongyloides*, após a análise do DNA ribossomal, foram descritos como pertencentes ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongylidae¹². Neste gênero estão incluídas aproximadamente 60 espécies, que parasitam principalmente mamíferos, ocorrem também em aves, répteis e anfíbios, com grande interesse médico e veterinário¹⁶. No entanto, somente duas espécies podem causar infecções no homem, *Strongyloides stercoralis* e *S. fuelleborni*¹³. Vale ressaltar que a espécie *S. stercoralis* é responsável pela maioria dos casos com distribuição mundial, enquanto que *S. fuelleborni* ocorre esporadicamente na Papua Nova Guiné¹³. No Brasil, Ribeiro da Luz em 1880, Lutz e Moraes em 1948, reforçaram a importância de *S. stercoralis* como agente etiológico da estrongiloidíase ou anguilulose¹⁵.

1.2 Epidemiologia da Estrongiloidíase

A estrongiloidíase é uma infecção global emergente não estimada em muitas regiões. Esta helmintíase é considerada endêmica nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1), com prevalência global estimada podendo chegar a aproximadamente 370 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo^{2,3,17}.

Figura 1- Distribuição mundial da estrogiloidíase³.

No estudo realizado por Schär *et al.*² sobre a estimativa da infecção por *S. stercoralis* na população geral nos anos de 1989 a 2011, foi demonstrado uma distribuição mundial heterogênea. Vale destacar que *S. fuelleborni* pode ser encontrado esporadicamente na África, Filipinas e Nova Guiné^{13,18}. As taxas de prevalência da infecção por *S. stercoralis* chegaram a 48,1% na Nigéria, seguida de 23,7% na Tailândia, 18,7% no Japão, 15% na Austrália, 13% no Brasil, 6,6% na Índia e por 2,7% nos Estados Unidos. Países como, Estados Unidos, Canadá, Espanha e Itália são considerados áreas esporádicas para a estrogiloidíase, sendo a maioria dos casos descritos ocorrendo em imigrantes ou turistas que visitaram países endêmicos¹⁹.

Na Europa Oriental, sabe-se pouco sobre a prevalência da infecção por *S. stercoralis*, sendo notificados focos espalhados, principalmente em pessoas idosas

na região mediterrânea². Por outro lado, países do Sul e Leste Europeu, Europa Central, ilhas do Caribe, Sudeste Asiático, América Latina e África Subsaariana, pode-se observar valores de prevalências maiores que 50% em várias regiões³. Nos países africanos os valores da infecção por *S. stercoralis* são variáveis, oscilando entre 0,1% a 91,8%^{2,20}. No Brasil os dados também demonstram a grande heterogeneidade de valores². Na revisão realizada por Paula e Costa-Cruz⁴ sobre dados da infecção por *S. stercoralis* no Brasil, foi demonstrado uma ocorrência média de 5,5%, entre os anos de 1990 e 2009. Segundo esses autores, os valores de ocorrências podem variar de acordo com a região, sendo a maior ocorrência de 7,9% na região Nordeste, seguida por 6,6% no Centro-oeste, 5,3% no Norte, 4% no Sul e 3,9% no Sudeste.

A estrogiloidíase pode ser considerada um importante problema médico e social no Brasil, sobretudo pela alta prevalência, e possibilidade de risco do desenvolvimento das formas graves da doença¹². Os principais fatores associados com a progressão mundial desta helmintíase são a falta de saneamento básico, utilização de água contaminada associado a falta de higiene, bem como o déficit de conhecimento de indivíduos em situações de risco³. Outro fator importante relacionado indiretamente com o aumento da taxa de infecção é a dificuldade de diagnosticar precocemente a infecção por *S. stercoralis*, uma vez que a falta de conhecimento da real prevalência desta helmintíase contribui para a sua condição de negligenciada dentre as parasitoses tropicais negligenciadas¹.

1.3 Aspectos biológicos de *S. stercoralis*

Espécies do gênero *Strongyloides* apresentam duas gerações, uma de vida parasitária e outra de vida livre, com a presença de fêmeas parasitas na primeira e dimorfismo sexual na segunda^{12,13}. O nematódeo *S. stercoralis* apresenta diferentes

formas evolutivas bem distintas durante o seu ciclo de vida: fêmea parasita, fêmea e macho de vida livre, larva rabditoide, larva filarioide e ovo²¹. As larvas filarioides, infectantes, medem cerca de 600µm de comprimento, possuem esôfago longo e cilíndrico, típico para este estágio, do tipo filariforme; vestíbulo bucal curto; e apresenta extremidade posterior uma cauda entalhada característica. A fêmea parasita tem um aspecto filariforme, apresenta esôfago do tipo filariforme, porém maior que as larvas infectantes, medindo 2mm de comprimento; sua extremidade anterior é arredondada e a posterior afilada. Os vermes adultos, machos e fêmeas de vida livre, apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos menores medindo aproximadamente 700µm de comprimento, e as fêmeas maiores medindo de 0,8 a 1,2 mm; ambos apresentam esôfago rabditoide e extremidade afilada. Os ovos são elípticos, de casca fina, medindo cerca de 50µm e são eliminados larvados. E larvas rabditoides apresentam comprimento de aproximadamente 250µm, com esôfago tipicamente rabditoide, subdividido em corpo, istmo e bulbo; vestíbulo bucal curto; e cauda pontiaguda^{13,21}. O ciclo biológico de *S. stercoralis* é monoxênico, podendo ser direto (partenogenético) ou indireto (vida-livre)¹². O homem adquire a infecção pela penetração ativa das larvas filarioides (L3) na pele, mucosa oral ou esofágica do hospedeiro (Figura 2). No ciclo direto, as larvas L3 atingem a corrente sanguínea, alcançam o coração e pulmões, se transformando em L4. Em seguida, atravessam a árvore brônquica, atingem a faringe podendo ser expectoradas ou deglutidas. Ao atingirem o intestino delgado, se transformam em fêmeas partenogenéticas, e se alojam nas criptas de Lieberkühn, na porção superior do jejuno, onde fazem a postura em média de 30 a 40 ovos por dia. Os ovos atingem rapidamente a maturidade e as larvas rabditoides (L1) eclodem do ovo e migram para a luz intestinal, e então são eliminadas pelas fezes^{13,21}. O ciclo direto acontece após as larvas L1 evoluírem para L3 no solo ou na pele da região anal ou perianal do hospedeiro (Figura 2)¹². No ciclo indireto, as larvas L1 recém eliminadas pelas fezes dos hospedeiros, ao atingirem o

solo sofrem quatro mudas transformando-se em fêmeas e machos de vida livre, que em condições favoráveis de temperatura e umidade se acasalam, produzem ovos, que evoluem para larvas L3, completando o ciclo após penetração ativa na pele de um novo hospedeiro^{3,21}.

Figura 2- Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis*, adaptado de CDC²².

A transmissão de *S. stercoralis* pode ocorrer de três formas distintas: a heteroinfecção, autoinfecção interna e autoinfecção externa¹². A penetração direta das formas L3 pela pele do hospedeiro, denominada de heteroinfecção, é a principal forma de transmissão, pode perdurar desde a infância até a fase adulta dos indivíduos sem manifestações de sintomas⁶. Na autoinfecção interna, as larvas L1

presentes no intestino delgado se transformam em L3 no intestino grosso e, em vez de seguirem para o lúmen e serem eliminadas pelas fezes, penetram novamente na mucosa intestinal e, na autoinfecção externa, as L3 penetram a pele perianal causando novamente a infecção^{6,23}. O processo de autoinfecção é responsável pela permanência do parasito no hospedeiro durante décadas sem novas exposições^{12,13,21}. Hábitos como caminhar descalço, manter contato direto com solo, ou frequentar locais com condições precárias de saneamento básico contribuem para a transmissão de *S. stercoralis*².

1.4 Resposta Imune do Hospedeiro

A resposta imune do hospedeiro a infecção por *S. stercoralis* não é totalmente elucidada, mas sabe-se que envolve a resposta T dependente do tipo helper 2 (Th2) com produção de interleucinas (IL), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, anticorpos IgG, IgA, IgE, bem como a ação de mastócitos, basófilos, eosinófilos e células B^{12,21,24}.

Inicialmente ocorre o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos que agem diretamente contra as larvas através da resposta imune inata²⁵. Os eosinófilos desempenham um papel crucial na ativação da resposta imune adaptativa, sobretudo na liberação de citocinas necessárias para produção de IgM²⁶.

Na resposta imune adaptativa, destaca-se a ação de diferentes citocinas: IL-5 responsável pela ativação de eosinófilos e pela produção de IgA; IL-4 estimula a migração e adesão de eosinófilos, com o auxílio da IL-13 estimula a produção de IgE e IgG1 pelas células B; IL-6 estimula granulócitos, células B e T; enquanto que a IL-10 e IL-13 modulam negativamente a ativação das células T helper 1 (Th1)^{12,21}.

Como o ciclo do parasito envolve as mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA^{12,27}. Anticorpos IgA estão

relacionados com a modulação da eliminação das larvas, sobretudo pela diminuição da fecundidade da fêmea e da viabilidade dos ovos^{12,28}.

1.5 Manifestações clínicas da strongiloidíase

A strongiloidíase é uma geohelmintíase causada principalmente pelo nematódeo *S. stercoralis*²⁹. Frequentemente encontrado em viajantes e ex-veteranos de guerra, imigrantes, habitantes imunocomprometidos e pessoas expostas ao solo. Esta helmintíase possui amplo espectro de manifestações que variam de doenças assintomáticas, agudas, crônicas a hiperinfecção, além de uma doença disseminada. Os quadros clínicos graves podem ser fatais, principalmente em indivíduos imunocomprometidos^{6,30}.

As manifestações agudas podem ocorrer precocemente desde o contato inicial, após a penetração das larvas filarioides na pele e da sua migração pelos tecidos. Os sintomas observados são eritemas serpentinóides no local de contato da larva com a pele, tosse mimetizando asma pela migração da larva pelos pulmões, dor abdominal, diarreia aquosa, cólicas, inchaços abdominais e, em alguns casos, constipação, devido ao alojamento e maturação das larvas no intestino delgado³¹.

A strongiloidíase crônica ocorre de maneira assintomática ou oligossintomática. Geralmente, os sintomas são leves e inespecíficos como dor abdominal, vômitos, diarreia e eosinofilia^{6,21}. Formas leves são assintomáticas, enquanto formas moderadas e graves apresentam manifestações com sintomas gastrintestinais, como dores abdominais, vômitos intermitentes, desnutrição ou retardo no crescimento em crianças e adolescentes, anorexia, diarreia e constipação intestinal⁶.

A strongiloidíase em indivíduos imunocompetentes tende a se desenvolver de forma crônica e assintomática²¹, no entanto, pode ocorrer em alguns casos anemia,

eosinofilia, palpitações, incontinência urinária e emagrecimento^{6,12}. Sintomas respiratórios e cutâneos também podem ocorrer durante a fase crônica, como dispnéia, tosse seca, sibilos e hemoptise, além de sinais dermatológicos provocados pela penetração da larva na pele³².

Em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles em terapia imussupressiva, portadores do vírus HTLV-1, com doenças malignas, alcóolatrás, diabéticos, transplantados e idosos^{33,34}, a doença pode assumir extrema gravidade, podendo evoluir para formas graves como hiperinfecção ou doença disseminada. Na hiperinfecção há aumento no número de parasitos presentes nos sistemas gastrointestinais e pulmonares^{21,33}. Vale ressaltar que o uso de corticosteróides em doses supressivas constitui o principal fator de risco para a síndrome de hiperinfecção, estando associado ao aumento de duas a três vezes de chances de desenvolvê-la. Uma vez que os corticosteroides reduzem os eosinófilos circulantes, induzem a morte de linfócitos imaturos; e consequentemente interferem na resposta de mastócitos presentes na mucosa jejunal, aumentando a liberação de larvas infectantes^{6,34}. Além disso, possuem similaridade com os ecdisteroides (hormônios da muda), atuando como sinalizadores para o desenvolvimento de ovos e larvas rabditoides, levando a transformação em larvas filarioides, e consequentemente à doença disseminada¹⁸.

Diversos autores associam a maior frequência de formas graves da strongiloidíase com a imunossupressão. Geri *et al.*³⁵ descreveram que a hiperinfecção está relacionada com o grau de imunossupressão do hospedeiro, onde as principais causas foram o uso de corticoterapia (83,5%), doenças autoimunes (24,8%), doenças hematológicas malignas (20,3%) e infecção pelo vírus HIV (10,7%). Em pacientes alcóolatrás a frequência da infecção por *S. stercoralis* foi maior (33,3%), em relação do grupo controle (5%), principalmente naqueles que já

apresentam cirrose hepática³⁶. No estudo de Silva *et al.*³⁷, foi observado um resultado semelhante, com ocorrência de 23,5% de *S. stercoralis* em pacientes alcoólatras, e de 5,4% em pacientes não alcoólatras. No Brasil a prevalência descrita de *S. stercoralis* em pacientes com infecção pelo HIV é de 4,5% a 5,5%^{38,39}. A infecção por HIV tem sido considerada por alguns autores como um fator de risco independente para a infecção pelo *S. stercoralis*⁴⁰.

A forma disseminada da estrogiloidíase é caracterizada pela presença de larvas em diferentes órgãos como: vesícula biliar, rins, cérebro, tireóide, coração, pâncreas, fígado, linfonodos e adrenais, fora dos sítios usuais do parasito^{6,21,33}. Nesses casos, pode-se observar a ocorrência de infiltrado pulmonar, febre, dor abdominal, diarreia, além de infecção bacteriana secundária^{33,41}. A migração de grande número de larvas filarioides permite uma porta de entrada de bactérias entéricas gram-negativas, resultando em quadros graves de infecção secundária, como meningite, derrame pericárdico e pleural, abdômen agudo e perfuração intestinal, com elevada mortalidade^{6,21,33}.

1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico definitivo da infecção por *S. stercoralis* ocorre principalmente pela visualização das formas larvárias nas fezes dos indivíduos infectados²¹, no entanto, na maioria das vezes não se utiliza métodos parasitológicos adequados para a pesquisa de larvas. Isto tem um efeito direto sobre a determinação da real prevalência desta helmintíase^{1,6}. O diagnóstico da estrogiloidíase pode ser realizado por métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares²¹.

Baseando-se na observação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes, os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade, sobretudo com a análise de uma única amostra fecal, podendo ocorrer resultado falso negativo em 70% ou mais dos

casos, principalmente pela baixa carga parasitária e excreção larval irregular. A sensibilidade de diagnóstico aumenta para 50%, com análise de três amostras, e é superior a 90%, se examinadas sete amostras de fezes^{42,43}. Assim, o diagnóstico desta infecção por exames parasitológicos torna-se difícil^{8,44}.

Diversos métodos parasitológicos podem ser utilizados para a pesquisa de *S. stercoralis*, como a sedimentação espontânea ou a centrifugação em formol éter. No entanto, os métodos de concentração como Baermann⁴⁵, adaptado por Moraes⁴⁶ e o de Rugai *et al*⁴⁷, fundamentados no hidro e termotropismo larval, são os mais indicados para a pesquisa de larvas nas fezes. Os métodos de cultura têm sido associados à maior sensibilidade no diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase, principalmente a cultura em placa de ágar⁴⁸ e em papel de filtro⁴⁹. O método de cultura em placa de ágar baseia-se na visualização de rastros das larvas deixados na superfície do meio após o arraste de bactérias sob o substrato, mas apesar de serem mais sensíveis do que os métodos anteriores envolvem maior custo e tempo para a obtenção dos resultados^{21,50}. Entre os métodos utilizados para pesquisa de larvas o de Baermann- Moraes é o mais utilizado, apesar de apresentar menor sensibilidade do que a cultura em placas de ágar⁴⁸. Este método também tem sido utilizado para a recuperação de larvas e de vermes adultos para a produção de antígenos, estudos biológicos, além da triagem de novos medicamentos *in vitro*^{9,51}.

De um modo geral, os métodos parasitológicos estão associados a menor sensibilidade principalmente nos casos de infecção crônica e assintomática, as quais são relacionadas com a baixa carga parasitária. Assim, recomenda-se a utilização de no mínimo três amostras de fezes coletadas em dias alternados, analisadas por métodos mais indicados para a pesquisa de larvas^{8,9, 50}.

A inexistência de um padrão-ouro⁵² tem estimulado a pesquisa de metodologias alternativas para melhorar o diagnóstico da estrogiloidíase^{44,53,54}. Técnicas imunológicas e moleculares têm sido utilizadas como diagnóstico complementar da estrogiloidíase, por apresentarem maior sensibilidade quando comparado às técnicas parasitológicas^{8,44}.

As técnicas sorológicas comumente utilizadas são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e *Western Blotting* (WB)⁸. Os testes sorológicos são facilmente executados, principalmente pela facilidade de obtenção de amostras de soro, a partir do sangue coletado. Pode-se realizar a pesquisa de diferentes anticorpos (IgG, IgA, IgM ou IgE) que reagem aos extratos ou frações proteicas antigênicas obtidos do parasito^{8,21}. Além disso, os testes sorológicos apresentam boa acurácia diagnóstica, com bons valores de sensibilidade e especificidade⁵⁵, e têm sido utilizados para acompanhamento de pacientes após tratamento. Uma das dificuldades descritas para a realização dos testes imunológicos é a obtenção de larvas de *S. stercoralis* em quantidades suficientes para a produção de antígenos. Assim diversos estudos têm demonstrado o uso de espécies parasitas de roedores, *S. rattii* e *S. venezuelensis*, como fonte segura de antígenos heterólogos para realização do diagnóstico imunológico, baseando-se principalmente na alta reatividade cruzada com a espécie homóloga, além disso não apresentam riscos de contaminação para seus manipuladores^{8,21}.

Diferentes preparações antigênicas podem ser utilizadas no diagnóstico da estrogiloidíase humana, principalmente antígenos totais de extratos de larvas infectantes de várias espécies de *Strongyloides*. Diversos autores têm demonstrado que o extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* pode ser

considerado uma excelente fonte de antígeno heterólogo para a detecção de infecções por *S. stercoralis*^{11,56-58}.

A pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* pela RIFI foi inicialmente proposta utilizando como antígeno larvas vivas ou particulada de *S. ratti* e *S. stercoralis*. Recentemente a RIFI foi utilizada na pesquisa de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes imunodeprimidos, utilizando cortes congelados de larvas de *S. venezuelensis*, e os valores de sensibilidade e especificidade foram de 95,4% e 95,8%, respectivamente⁸. Além disso, foi demonstrado que a RIFI apresenta boa sensibilidade para a pesquisa de anticorpos IgA e IgG em amostras de leite e de soro de mulheres infectadas com *S. stercoralis*²⁷.

Western blotting (WB) constitui uma técnica de alta especificidade para a infecção por *S. stercoralis*, com reduzida reatividade cruzada, podendo ser utilizada como teste confirmatório no diagnóstico da estrogiloidíase⁵⁹. A utilização do *WB* tem permitido a identificação de frações antigênicas que são especificamente reconhecidas por anticorpos presentes em amostras de soros de pacientes infectados com *S. stercoralis*. Estudos demonstraram que as frações proteicas de 41, 31 e 28 KDa foram reconhecidas por anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com estrogiloidíase⁶⁰.

A pesquisa de coproantígenos de *S. stercoralis* em amostras de fezes de pacientes infectados tem sido considerada uma outra importante ferramenta para o diagnóstico⁶¹. No entanto, ainda são necessários estudos adicionais para avaliar o seu desempenho no diagnóstico da estrogiloidíase.

Em estudos recentes foi observado que os testes sorológicos são mais sensíveis que a análise microscópica de fezes, mas por outro lado, pode ser também relacionado com resultados falso positivo devido às reações cruzadas e persistência

ao longo prazo de anticorpos após um tratamento^{8,44,62}. Neste contexto, tem sido proposta a utilização de antígenos recombinantes para melhorar a especificidade dos testes sorológicos. Os antígenos recombinantes têm apresentado reatividade semelhante aos antígenos somáticos das larvas de *S. stercoralis*, sendo alguns mais específicos^{53,54,63}. Os peptídeos recombinantes, ricos em prolina, são especificamente reconhecidos por anticorpos IgG4 e IgE, sem reações cruzadas com outros helmintos⁶³. No entanto até o momento os antígenos recombinantes não são aplicados na totalidade do diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana, sobretudo nas áreas endêmicas^{62,63}.

As técnicas moleculares vêm sendo progressivamente utilizadas para o diagnóstico de parasitoses intestinais, baseando-se na detecção de DNA dos parasitos nas fezes^{8,64}. Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem demonstrado maior sensibilidade que os métodos parasitológicos convencionais, demonstrando ser uma alternativa útil^{8,65}. Repetto *et al.*⁶⁴ também confirmaram o desempenho superior da PCR em relação a cultura em placa de ágar, no diagnóstico da estrongiloidíase. Apesar da PCR apresentar-se como um método sensível e específico para o diagnóstico de *S. stercoralis*, a técnica não tem sido utilizada para o uso em situações clínicas. Além disso, a sua variação de sensibilidade entre diferentes estudos desperta um fator preocupante quanto aos resultados negativos²⁹.

Assim o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais sensíveis para a detecção da estrongiloidíase crônica e assintomática é necessário^{8,21,44}. Neste contexto, a combinação de análises proteômicas e sorológicas podem ser aplicadas como uma nova ferramenta na descoberta de marcadores diagnósticos. Esta metodologia tem sido utilizada com sucesso na identificação de antígenos específicos, na detecção de fatores de virulência e de marcadores de diagnóstico⁶⁶.

1.7 Proteômica

O proteoma constitui o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula ou organismo, em resposta a estímulos internos e externos⁶⁷, bem como revela o repertório de proteínas codificadas pelo genoma⁶⁸. Neste contexto, a Proteômica tem permitido o estudo de amostras biológicas complexas, possibilitando a identificação e quantificação de milhares de proteínas. Por reunir ferramentas que fornecem informações sobre modificações pós-traducionais, interações proteicas e também possibilita o estudo de alterações metabólicas ocorridas em um organismo^{69,70}.

Uma das tecnologias da proteômica a se estabelecer foi a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, que é reconhecida como o método de separação simples e eficaz para a análise global de um determinado extrato proteico. As proteínas são separadas de acordo com o ponto isoelétrico na primeira dimensão e, em seguida, submetidas à separação por massa molecular na segunda dimensão, com auxílio de uma matriz polimérica (acrilamida/bisacrilamida)⁶⁸. Com avanços nas técnicas nos estudos proteômicos, a “*Shotgun Proteomics*” tornou possível a determinação rápida do conteúdo proteico de diferentes amostras de parasitos, incluindo as moléculas do tegumento, proteínas somáticas e seus produtos de secreção/excreção. Assim, utilizando a digestão proteica em solução, seguido pela separação dos peptídeos por cromatografia, acoplada a um espectrômetro de massas pode-se determinar e quantificar rapidamente o conjunto proteico presente na amostra⁷¹. Com isso a proteômica constitui uma estratégia interessante para o estudo de padrões de expressão proteica de diferentes parasitos a partir da análise de bancos de dados de espécies relacionadas^{72,73}.

No contexto do gênero *Strongyloides* poucos estudos têm sido realizados até o presente. Recentemente, alguns autores utilizaram a análise proteômica para caracterizar as proteínas de *S. stercoralis*⁷⁴⁻⁷⁶ e de outras espécies como *S. ratti*⁷⁷ e

S. venezuelensis^{78,79}. Estes estudos têm apontado para diversas proteínas que podem estar relacionadas com a relação parasito-hospedeiro, principalmente na regulação da resposta imune do hospedeiro e ainda apontam algumas que podem ser aplicadas no imunodiagnóstico. Assim a análise proteômica pode nos fornecer dados que podem aumentar o nosso conhecimento sobre a biologia parasitária, o que consequentemente pode nos levar à descoberta de novos marcadores diagnósticos ou candidatos a vacinas contra a infecção por helmintos⁶⁶.

1.8 Estrongiloidíase experimental

1.8.1 Aspectos biológicos de *S. venezuelensis*

A espécie *S. venezuelensis* foi relatada pela primeira vez na Venezuela juntamente com *S. ratti*, infectando ratos selvagens (*Rattus norvegicus*)¹⁶. Amplamente distribuído em regiões quentes do mundo, *S. venezuelensis* também foi relatado em Israel, Brasil e Japão^{80,81,82}. Ambas as espécies, parasitos de roedores, são utilizadas no estudo da relação parasito-hospedeiro, na produção de antígenos heterólogos para o desenvolvimento de métodos sorológicos para a estrongiloidíase humana, além de estudos sobre a eficácia de drogas¹⁶.

O ciclo biológico de *S. venezuelensis* nos roedores é muito semelhante ao que ocorre na infecção por *S. stercoralis* no homem. Em roedores *S. venezuelensis* desencadeia o ciclo pulmonar de forma semelhante ao provocado pelo *S. stercoralis* nos humanos. Algumas diferenças podem ser pontuadas no ciclo biológico de *S. venezuelensis* e *S. stercoralis*, como a não eliminação de larvas e sim de ovos nas fezes do hospedeiro, e a não ocorrência do processo de auto-infecção na infecção por *S. venezuelensis*¹⁶.

O pico de eliminação de ovos na infecção por *S. venezuelensis* em roedores ocorre entre o 5º e 8º dias pós infecção (d.p.i.)^{83,84}. Maiores quantidades de fêmeas partenogênicas são encontradas nas porções iniciais do intestino delgado (duodeno e jejuno)⁸⁴. A eliminação da infecção varia de acordo com a espécie de roedor, em camundongos ocorre entre 12º e 14º d.p. i.^{85,86}; por outro lado, em ratos ocorre entre 24º a 42º d.p.i. ou tardiamente entre 70º a 79º d.p.i. A resolução da infecção ocorre principalmente devido a resistência natural dos hospedeiros ao parasito^{84,86,87}.

1.8.2 *Rattus norvegicus* como modelo experimental

R. norvegicus é pertencente à família Muridae⁸⁸, é amplamente utilizado na pesquisa biomédica que abrange as áreas de toxicologia, gerontologia, cardiologia, endocrinologia, odontologia, imunologia, reprodução, neurociência e parasitologia⁸⁹. Fatores relacionados ao hospedeiro como idade, sexo e base genética podem influenciar diretamente a carga parasitária⁹⁰. Estudos realizados com nematódeos intestinais utilizando linhagens isogênicas de roedores demonstram a influência de fatores genéticos associados à resistência e a suscetibilidade à infecção⁹¹.

No contexto da estrogiloidíase, *R. norvegicus* eliminam considerável número de ovos nas fezes quando infectados, a coprocultura de *S. venezuelensis* é facilmente realizada e não oferece risco de infecção a seus manipuladores. Fato que contribuem para manutenção da produção de antígeno no laboratório de forma constante e segura⁸. Assim *R. norvegicus* constitui um excelente modelo experimental para o estudo da estrogiloidíase.

1.9 JUSTIFICATIVA

A estrogiloidíase é uma doença negligenciada sendo considerada um problema de saúde pública mundial. Além disso, esta helmintíase apresenta dificuldades em seu diagnóstico parasitológico, uma vez que se trata de uma parasitose com reduzida e intermitente liberação de larvas nas fezes. Este fato tem contribuído nos últimos anos para pesquisas voltadas para técnicas diagnósticas complementares aos métodos parasitológicos, sensíveis e específicas. E neste contexto, as técnicas sorológicas por sua praticidade tem se destacado como ferramenta complementar ao diagnóstico da estrogiloidíase. A detecção de anticorpos utilizando antígeno heterólogo, principalmente *S. venezuelensis*, vem sendo amplamente estudado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana^{8,10,56,57,92}. Associado a isto, as técnicas proteômicas objetivando a elucidação do conteúdo total de um organismo, principalmente a “*Shotgun Proteomics*” podem elucidar a composição proteica de estágios evolutivos de *S. venezuelensis*. Sabendo-se que várias biomoléculas, incluindo proteínas somáticas e/ou secretado/excretado de parasitos, como no gênero *Strongyloides*, contribuem para a sua sobrevivência, em diferentes hospedeiros^{77,93}. Além disso, a combinação de análises proteômicas e sorológicas podem promover uma abordagem experimental mais racional na descoberta de biomarcadores de diagnóstico. Portanto, este projeto utiliza a proteômica como ferramenta para obter informações sobre o conteúdo proteico de estágios evolutivos de *S. venezuelensis*, além de utilizar o modelo experimental para verificar o reconhecimento de proteínas ao longo da infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- a) Realizar análise proteômica utilizando os estágios evolutivos de larvas filarioides (L3) e fêmeas parasitas (FP) de *S. venezuelensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar a análise proteômica por *Shotgun* dos estágios evolutivos de L3 e de FP de *S. venezuelensis*;
- b) Avaliar o conjunto proteico do estágio de L3 para a busca de alvos diagnósticos;
- c) Avaliar o reconhecimento da fração purificada do extrato proteico de L3 em coluna de afinidade α -lactose agarose por anticorpos presentes em amostras de soros dos animais infectados experimentalmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP) sob número de protocolo CEUA-IMT 317A. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em Pesquisa Animal determinados pelo (CEUA) e Biotério do IMT/USP.

3.2 Manutenção da cepa de *S. venezuelensis*

A cepa de *S. venezuelensis* foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), e tem sido mantida no Biotério do IMT/USP (LIM06) em ratos (*R. norvegicus*) linhagem Wistar (CEUA-IMT 0356A). Todos os animais utilizados foram obtidos no Biotério de Produção da Rede de Biotérios da Universidade São Paulo (USP), sendo originários da colônia de ratos Wistar Hannover da *Charles River Laboratories*. Os animais, com 30 dias de vida e aproximadamente 120g, permaneceram a uma temperatura de 22C° e a umidade do ar entre 60% e 70%, em ciclos de foto período (12h escuro, 12h claro, iniciando às 7h) em gaiolas apropriadas, alimentados com água e ração *ad libitum*, maravalha previamente autoclavada e a limpeza realizada duas vezes por semana.

3.3 Infecção com *S. venezuelensis*

Os animais foram infectados por via subcutânea com aproximadamente 4000 larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis* obtidas a partir da cultura de fezes (8°d.p.i.) de *R. norvegicus*. Brevemente as larvas L3 foram obtidas pelo método de Looss⁹⁴, no qual as fezes foram homogeneizadas em água e carvão, e mantidas durante 48

horas em estufa *BOD- Biochemical Oxygen Demand* (TE 390®, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 28°C. Após serem mantidas, essas larvas foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola⁴⁷, baseando-se no termo e hidrotropismo das larvas. A coprocultura foi colocada em contato com a água aquecida a 37°C em cálice de sedimentação, o sedimento foi recolhido com pipeta *Pasteur* e analisado em microscópio óptico *Olympus CH2* (Olympus®, Japão) em objetiva de 10X. A quantificação das larvas L3 foi realizada pela estimativa da leitura em todo o sedimento. Parte das larvas L3 recuperadas foram utilizadas para a infecção experimental, uma segunda parte para a manutenção da cepa, e o restante foi armazenado a -20°C.

3.4 Obtenção das formas evolutivas de *S. venezuelensis*

3.4.1 Larvas filarioides (L3)

As larvas L3 foram recuperadas como descrito no item 3.3, utilizando a coprocultura e o método de Rugai, Mattos e Brisola⁴⁷. Foram armazenadas a -20°C para posterior obtenção do extrato proteico.

3.4.2 Fêmeas parasitas (FP)

Para a obtenção das fêmeas FP, os animais infectados provenientes da manutenção da cepa foram eutanasiados no 7° a 8° d.p.i. Brevemente, o intestino delgado desses animais foram removidos, colocados em placas de *Petri* contendo solução salina (NaCl 0,85%) e seccionados longitudinalmente. Após a secção os intestinos foram colocados em contato com solução salina aquecida a 30°C em cálice de sedimentação, permanecendo em estufa *BOD- Biochemical Oxygen Demand* (TE

390®, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 28°C por 4 horas. Todo o sedimento foi coletado e armazenado a -20°C até o momento de uso.

3.5 Produção dos extratos proteicos de *S. venezuelensis*

O extrato salino das formas evolutivas (L3 e FP) de *S. venezuelensis* foi obtido com aproximadamente 1mL de cada forma evolutiva (contendo aproximadamente 200.000 L3 e 500 FP). Inicialmente foi realizada a maceração de cada forma evolutiva em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo e almofariz. Após os ciclos de maceração o conteúdo foi resuspenso em tampão de extração (Tris-HCl 25mM, pH 7,5; acrescido de 1mM de DTT- Ditioneitol e coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich, St. Louis*®, MO, USA)), seguido por centrifugação a 12.400g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante deu origem ao extrato proteico. Foi realizado a dosagem protéica utilizando o *Kit DC Protein Assay* (*Bio Rad Laboratories*®, Hercules, CA, USA), baseada no método de Lowry *et al.*⁹⁵. Os extratos após a dosagem de proteínas foram aliquotados e armazenados a -20°C até o momento do uso.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das frações antigênicas

Aproximadamente 20µg/mL de cada extrato proteico foram submetidos a eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não redutoras, de acordo com Laemmli⁹⁶. O gel de poliacrilamida de 12% foi preparado entre placas de vidro (10x10cm) com espaçadores de 0,7 mm de espessura em suporte próprio do sistema Enduro de cuba eletroforética vertical para mini- gel (*Labnet International*®, Inc., New York, United States). Foi preparado um gel de separação utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, solução de acrilamida 30% e

bis-acrilamida 0,8%, TEMED (N, N, N, N- tetrametiletilenodiamino) 0,125%, APS (Persulfato de amônio) 0,125% e água destilada. A solução foi preparada e adicionada lentamente entre as placas seladas, para evitar a formação de bolhas no gel. O gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCL 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1%, solução de acrilamida e bis-acrilamida a 5%, TEMED 0,125%, APS 0,125% e água destilada.

Os extratos proteicos foram resuspensores em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 50mM, azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas a 100°C em banho seco por 5 minutos para desnaturação proteica e em seguida foram plotados no gel. Foram colocadas nas cubas tampão de corrida Tris (25 mM), Glicina (192 mM) e SDS (3,5 mM), a migração dos polipeptídeos foi realizada em corrente 20mA/gel e voltagem de 150V por aproximadamente 2 horas. Findo a eletroforese, o gel foi corado com 5% de *Coomassie brilliant blue R-350* (GE Healthcare®). As massas moleculares dos extratos de L3 e de FP de *S. venezuelensis* foram determinadas por regressão linear, de acordo com padrão de massa molecular de referência. Foi utilizado o padrão de massa molecular (10 a 260KDa- *Thermo Fischer Scientific®*, Waltham, MA, USA).

3.7 Digestão trípica em solução

Alíquotas de 50µg dos extratos proteicos de L3 e FP de *S. venezuelensis* foram diluídos em bicarbonato de amônio 25mM e depois utilizados para a digestão da solução. Amostras de proteínas foram incubadas com *RapiGest* a 1% (*Waters®*) a 80°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram reduzidas com a adição de 60mM de ditioneitol (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, MO, USA) a 60°C por 10 minutos e alquiladas com a adição de 180mM de iodoacetamida (*Sigma Aldrich®*, St. Louis, MO, USA) no escuro por 45 minutos. Após esse processo, as amostras foram

digeridas pela adição de tripsina (*Promega*®) na proporção de 50: 1 (proteína / tripsina) seguida de 16h de incubação a 37°C. A digestão triptica foi interrompida acidificando a amostra adicionando ácido acético a 0,5% (v / v) (*J.T. Baker*®) e foi verificado um pH de ≤ 2 . As amostras foram incubadas a 37°C por 45 minutos para clivagem induzida por ácido *RapiGest* e o sal foi removido por centrifugação a 20.000g por 15 minutos a 7°C. As amostras estavam então prontas para análise de espectrometria de massa.

3.7.1 Identificações de proteínas por espectrometria de massas

A cromatografia líquida foi realizada em um *nano UHPLC Dionex Ultimate*® 3000 (*Thermo Scientific*®, *Bremen*) equipado com uma coluna Nano-Trap Acer PepMap100 C18 (100 μm $\times$ 2 cm, esferas de 5 μm , 100 Å poros, *Thermo Scientific*®) seguido por uma coluna analítica Acclaim PepMap100 C18 (75 μm $\times$ 15 cm, contas de 2 μm , 100 Å poros, *Thermo Scientific*®). Um gradiente não linear de eluente A (0,1% de ácido fórmico) a B (0,1% de ácido fórmico em 80% de acetonitrilo) foi aplicado como segue: começando com 3 minutos de 3,8% de solvente B, indo então de 3,8 a 30% de solvente B em 117 minutos e depois a 55% do solvente B em 30 minutos, depois a coluna foi lavada com 99% e reequilibrada com 3,8% de solvente B. Os peptídeos foram ionizados utilizando uma fonte de *nano electrospray* e detectados em Q-Exactive™ (*Thermo Scientific*®, *Waltham*, Massachusetts, EUA). A fonte de íons operou 3,8 kV em modo positivo com uma temperatura capilar de 250°C. Os íons precursores foram medidos com uma resolução definida em 70.000 (faixa de 300-2000 m / z) e um alvo AGC de 1e6 íons em até 120ms. Íons precursores foram selecionados para fragmentação por um método dependente de dados no qual os 12 íons mais intensos com cargas entre +2 e +4 foram selecionados, dado um tempo de exclusão de 40s. Em seguida, aplicou-se um método de dissociação

colisional de alta energia (HCD) com energia de colisão normalizada de 28-30V para obtenção dos fragmentos. O MS/MS foi obtido com uma resolução definida em 17.500 (mínimo de 120m/z e viúva de isolamento de 1.2m/z) e um alvo AGC de 5 e 5 (mínimo de AGC alvo de 6.25×10^3 e tempo máximo de injeção de 60).

3.7.2 Análise dos dados proteômicos

Os dados de espectros de MS/MS adquiridos foram submetidos ao banco de dados de *proteínas* *Sequest* HT usando o *software* *Proteome Discoverer* 1.4 (*Thermo Scientific*®, EUA). A fim de discriminar o íon precursor do detector de área, foi escolhida a abordagem livre de rótulo. Os parâmetros para a pesquisa foram os seguintes: a tripsina foi especificada como a enzima para clivagem proteica, permitindo até 1 clivagens perdidas. A oxidação (M) e a carbamidometilação (C) foram estabelecidas como modificações dinâmicas e fixas e foram consideradas tolerâncias de massa para fragmentos a 0,1kDa. Os dados gerados a partir de análises de espectrometria de massas foram pesquisados na base de dados de proteínas do Uniprot *Strongyloides*. Uma confiança de proteína foi considerada quando dois ou mais peptídeos foram encontrados; taxa de descoberta falsa foi considerada em 1% para os níveis de proteína e peptídeos. A abundância de cada proteína foi calculada com base na média da área do cromatograma dos três peptídeos mais abundantes. Este valor foi utilizado para quantificação relativa de proteínas e para construção do gráfico *Volcano Plot* para análise estatística. A análise do *Gene Ontology* (GO) foi conduzida para classificar as proteínas de acordo com processos biológicos relacionados, funções moleculares e componente celular usando o *Software* *Blast2go*, em comparação com os dados disponíveis no banco de dados *Strongyloides* sp. no Uniprot.

3.8 Delineamento da infecção experimental

Um total de cinco animais foram infectados experimentalmente com 4000 larvas L3 de *S. venezuelensis* por via subcutânea e cinco animais foram mantidos sem infecção (controle negativo). Foram analisadas amostras de fezes e de sangue, em cada ponto da cinética experimental (7º, 14º, 21º, 28º e 35º d.p.i.). O sangue coletado foi proveniente de punção da veia lateral da cauda do rato, após a anestesia com Xilazina (20mg/mL) e KetaminaNP (50mg/mL). Em seguida foi centrifugado a 12.400g por 10 minutos para obtenção do soro, que foram estocados a -20°C até o momento de uso. Os animais foram submetidos à eutanásia somente no final do experimento.

No dia anterior aos pontos indicados os animais foram colocados em gaiolas sem maravalha para a coleta de toda a amostra de fezes. Essas amostras foram utilizadas para a realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

A eutanásia foi realizada pela administração do anestésico inalatório isoflurano. Após estes procedimentos os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e colocados no freezer (-20°C) até a coleta de lixo. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço da Saúde pautada na Resolução da Diretoria Colegiada - RDCNº306 da ANVISA e na Norma regulamentadora – NR Nº 32. O protocolo experimental seguiu o regimento da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IMT/SP, conforme normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.8.1 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

A contagem dos ovos foi realizada de acordo com o método descrito por Gordon e Whitlock⁹⁷. Em cada ponto da cinética experimental, aproximadamente uma grama

de fezes foi homogeneizado em solução saturada de NaCl (Cloreto de sódio), a mistura foi filtrada em peneira de *nylon*. Uma alíquota foi retirada e aplicada com cuidado, para não formar bolhas de ar, em cada um dos compartimentos da câmara de MacMaster. A câmara foi deixada em repouso por 5 minutos e, logo após, procedeu-se a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) em microscópio óptico *Olympus CH2* (*Olympus®*, *Japão*), em aumento de 10X.

3.9 Fração de Galectina (FL)

Baseando-se em resultados prévios do nosso grupo⁹⁸, foi realizada a purificação da fração “Galectina”. Uma alíquota do extrato proteico de L3 foi submetido à cromatografia em coluna de α -Lactose- agarose (*Sigma-aldrich®*, *St. Louis*, MO, USA). A coluna foi pré-lavada por três vezes com PBS-T e equilibrada com solução de extração de proteínas antes de receber o antígeno bruto, que foi homogeneizado durante a noite por 4°C. A coluna foi centrifugada e o sobrenadante forneceu a fração não ligada (FNL). A coluna de afinidade foi lavada com tampão de extração adicionado NaCl 300mM e finalmente lavada com solução de lactose (tampão de extração contendo NaCl 300mM e lactose 200mM). O eluato recuperado forneceu a fração de galectina (FL). Foi realizada a concentração protéica utilizando o *Kit DC Protein Assay* (*Bio Rad Laboratories*, *Hercules®*, CA, USA), baseada no método de Lowry *et al.*⁹⁵. O extrato foi armazenado a -20°C até o momento do uso, para a realização de SDS-PAGE 12%, seguido pela transferência e *Western blotting* específico para galectinas.

3.9.1 "Western Blotting" (WB)

Após o SDS-PAGE (como descrito no item 3.6), o conteúdo proteico (~140µg/mL) do extrato de L3 foi submetido a eletrotransferência para a membrana de PVDF (20µm) (*Bio- Rad Laboratories Head quarter®, Hercules, CA, USA*) em sistema Enduro de cuba eletroforética vertical (*Labnet International®, Inc., New York, United States*) para determinar o perfil das bandas proteicas reconhecidas pelas amostras de soros dos animais.

Foi utilizado um sistema de eletrotransferência para acondicionar o gel e a membrana, embedido em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,69mM e Etanol 20%), nas seguintes condições: amperagem de 20mA/gel e a voltagem 200V por aproximadamente 18 horas. Ao término da eletrotransferência as membranas foram cortadas em tiras de 3mm para a reação de "Western-blotting".

Para estabelecer as condições ideais de reação do WB, foram realizados diferentes ensaios. Para bloqueio de sítios inespecíficos, as tiras foram incubadas com solução de bloqueio (Tris-HCl 50Mm, *Tween20* 0,7% e Leite em pó desnatado 5%) durante uma hora em temperatura ambiente sob agitação lenta. Após este período foram realizadas três lavagens de 5 minutos em tampão de lavagem (Tris-HCL 1M pH 7,5 e água destilada). Em seguida, as membranas foram colocadas para reagir com "pools" de soros dos animais em cada ponto da cinética experimental (7°, 14°, 21°, 28° e 35° d.p.i.), diluídos a 1:50 em tampão diluição (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM 2%, *Tween20* 0,01% e leite desnatado em pó 5%), por aproximadamente 18 horas a 4°C sob agitação lenta. Após as 18 horas, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com solução de lavagem, sendo posteriormente adicionado o conjugado (anti-IgG de rato conjugado à peroxidase) na diluição de 1:2000 em tampão de diluição por 1h30 sob agitação em temperatura ambiente. Ao término, houveram três lavagens de 5 minutos com tampão de lavagem, e então foi realizado a exposição

com *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare®) para revelação em equipamento *Image Quant LAS 4000* (GE Healthcare®).

3.9.2 “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA)

Ensaio preliminares foram realizados para determinar as condições ideais de reação. Após a padronização, placas de alta afinidade (*Costar-Corning Incorporated®*, *corning*, *NY*, *USA*) foram sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno solúvel, em tampão Carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes em PBS pH 7,2 contendo *Tween20* (PBS-T) por 5 minutos e então bloqueadas com solução de leite desnatado em PBS-T 3% por 45 minutos a 37°C em estufa. Posteriormente, houve as lavagens e então foram adicionados 50µL das amostras de soro (1:20) diluídos em PBS-T, incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos. As placas foram lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50µL de anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (*Sigma- Aldrich®*, *St. Louis*, *MO*, *USA*) na diluição de 1:2000 por 45 minutos a 37°C em estufa. As placas foram novamente lavadas e houve a revelação pelo substrato TMB (Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina) por 15 minutos na ausência de luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi medida em leitora de microplaca (*Thermo Fischer Scientific®*, *Waltham*, *MA*, *USA*) no comprimento de onda de 450nm.

3.10 Análises estatísticas

A análise proteômica foi baseada na triplicata dos extratos proteicos de cada estágio evolutivo, sendo identificado as proteínas diferencialmente expressas para a construção dos gráficos de abundância.

A análise do ELISA foi baseada na curva ROC, considerando as amostras do grupo infectado em relação ao grupo controle, utilizando o programa *GraphPad Prism* 8.0, $p < 0,05$. Os resultados de reatividade dos soros foram expressos em média de densidade óptica (DO). A significância estatística foi determinada por One ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).

3.11 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização de equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo *et al.*⁹⁹.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterizações dos extratos proteicos de L3 e de FP de *S. venezuelensis*

Para a avaliação da qualidade dos extratos proteicos obtidos, foi realizada a SDS-PAGE 12%. A concentração proteica obtida foi de 2,2mg/mL para o extrato de L3 e 0,63mg/mL para FP de *S. venezuelensis*. Os extratos proteicos demonstraram misturas de proteínas de diferentes complexidades (Figura 3). Esta análise permitiu avaliar a integridade da preparação e o perfil eletroforético dos extratos proteicos, além de observar a definição de bandas. Pode-se observar que os extratos de L3 e FP de *S. venezuelensis* apresentaram diferentes frações proteicas (~140-100, 70, 40, 25kDa).

Figura 3- SDS-PAGE 12% do extrato proteico de larvas filarioides (L3) e de fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*. MM (Padrão de Massa Molecular).

4.2 Análise proteômica

4.2.1 Análise quantitativa dos extratos proteicos de L3 e de FP de *S. venezuelensis*

Para análise do proteoma dos extratos proteicos de L3 e de FP de *S. venezuelensis* por *Shotgun*, os dados foram confrontados com as sequências de proteínas disponível no Uniprot (*Strongyloides* sp.), utilizando o algoritmo *InterPro*. A análise *Shotgun* identificou um total de 1017 proteínas no extrato, considerando os dois estágios evolutivos, sendo que na L3 foram identificadas 686 e na FP 835 proteínas. Para classificação, foi utilizado o software *Blast2go*, e a busca por motivos estruturais característicos utilizando o algoritmo *InterPro*. Assim as proteínas foram classificadas de acordo com a função molecular, processo biológico e componente celular segundo as categorias do *Gene Ontology* (Gráfico 1).

Gráfico 1- Classificação de acordo com o *Gene Ontology* das proteínas identificadas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*, considerando nível 2.

Considerando o estágio de L3, 89,8% das proteínas identificadas foram relacionadas com a função molecular, 49,1% com o processo biológico e 42,4% como

componente celular. Na FP, 92,7% foram relacionadas com a função molecular, 75,5% com o processo biológico e 75,5% com componente celular. A abundância de uma proteína nos extratos foi definida pela média da área observada no cromatograma dos seus dois e três peptídeos mais abundantes. Esse valor foi utilizado para a quantificação relativa da proteína em cada extrato e para montagem do *Volcano Plot* (Gráfico 2) entre as diferentes amostras, e para obter a lista das proteínas diferencialmente expressas. Nos estágios de L3 e de FP, 56 e 227 proteínas foram diferencialmente expressas, respectivamente.

Gráfico 2-Representação gráfica das proteínas diferencialmente expressas nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*. Proteínas estão plotadas de acordo com os critérios de significância e abundância relativa.

Considerando as proteínas diferencialmente expressas em relação a função molecular, corresponderam a 89,8% e 92,7% nos estágios de L3 e de FP,

respectivamente (Gráfico 3). Pode-se observar que as maiorias das proteínas da FP estão relacionadas com os constituintes estruturais e ribossomais, ao contrário da L3 que estão relacionadas com diferentes funções enzimáticas.

Gráfico 3- Função molecular segundo o *Gene Ontology* das proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*.

Avaliando a triplicata dos extratos proteicos para cada estágio evolutivo foi possível determinar as proteínas diferencialmente expressas, considerando o *Heatmap* (Figura 4). Pode-se observar os padrões gerais de proteínas no conjunto de dados, as amostras foram classificadas distintamente nos dois estágios evolutivos.

Figura 4- Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico dos estágios de larva infectante (L3) e de fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*, segundo *Heatmap*. A expressão está em escala, onde o verde representa menor expressão e o vermelho maior expressão.

Considerando a identificação em pelo menos duas réplicas, as proteínas diferencialmente expressas nos estágios de L3 e FP foram agrupadas em categorias e localizadas de acordo com o Uniprot (Tabelas 1 e 2). Das proteínas diferencialmente expressas na L3, pode-se observar uma intensa atividade enzimática (*protein kinase, metalloendopeptidase, retinoid- inducible serine carboxy peptidase, dehydrogenase, synthase, prolyl 4-hydroxylase alpha, galactose oxidase*), algumas de membranas (*integrin, nematode cuticle collagen, E-F hand domain protein*), além de galectinas. Por outro lado, na FP foram identificadas 25 proteínas relacionadas com a síntese proteica (*translation initiation fator, trasncription fator, anamorsin*), seguido por 17 nucleares (*histone, helicase, argonaute protein*), 5 relacionadas com o processo de reprodução (*prohibitin, nuclear migration, zona pellucia*) e com a manutenção da homeostase celular (*transthyretin like family, diphosphate reductase, peroxiredoxin, heatshock protein 17 e 90*). Além disso, foram diferencialmente expressas proteínas específicas de nematódeos (*nematode fatty acid retinoide binding family*), proteínas ligadoras de lectinas (*legume like lectin family*) e *cathepsin D*. É válido ressaltar que 75 proteínas diferencialmente expressas na FP foram ribossomais.

Tabela 1- Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico de larva infectante (L3) de *S. venezuelensis*, identificadas na base de dados, agrupadas em categorias e localizadas de acordo com o Uniprot.

Grupo de Proteínas	Função	Localização	Nº de acesso
<i>Gamma-glutamyltranspeptidase</i>	Processo catabólico		A0A090LGU5
<i>Integrin/ Zona pellucida domain</i>	Adesão celular, reprodução e regulação		A0A090L9L6/ A0A090LTA8
<i>Calcium-transporting ATPase</i>	Regulação da locomoção, íons de cálcio e crescimento, desenvolvimento larval e ligação de ATP		A0A090LCI8, A0A090LUP8
<i>Nematode cuticle collagen</i>	Constituinte estrutural da cutícula	Membrana Celular/	A0A090LN40
<i>Immunoglobulin</i>	Processo de reconhecimento, ligação ou adesão das células	Transmembrana/	A0A090KT02
<i>TPM domain</i>	Função desconhecida	Plasmática/ Extracelular*	A0A090LJG4
<i>Zinc transporter</i>	Atividade do transportador transmembranar de íons metálicos		A0A090L9H0
<i>ATP-binding</i>	Atividade da ATPase		A0A090L1G5
<i>Epidermal growth</i>	Crescimento epidérmico		A0A090LS08
<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>	Invasão tecidual e atividade serina carboxipeptidase		A0A090KY59
<i>Calmodulin-like protein</i>	Ligação ao cálcio		A0A090KWM4
<i>CD109 antigen*</i>	Atividade inibidora endopeptidase		A0A090L9X7
<i>Dehydrogenase</i>	Atividade de isocitrato desidrogenase, Ligação de íons de magnésio e ciclo do ácido tricarboxílico	Mitocôndria	A0A090LJ20
<i>Amidinotransferase</i>	Atividade da transferase		A0A090LPC1
<i>kinase</i>	Ligação de ATP		A0A090MPM5, A0A090N0L8, A0A090L6C1, A0A090KUG1, A0A090LP45
<i>Galectin</i>	Ligação de carboidratos		A0A090KTV2
<i>Acidic leucine-rich nuclear</i>	Transdução de sinal intracelular		A0A090LHM9
<i>Galectin</i>	Ligação de carboidratos	Núcleo	A0A090KTV2
<i>Epimerase</i>	Processo celular		A0A090L356
<i>Transcription elongation factor</i>	Biossíntese de proteína e Fator de alongamento		A0A090LDW9
<i>Boia-like</i>	Divisão celular		A0A090LJW1
<i>Dipeptidase**</i>	Atividade da aminopeptidase, ligação de íons manganês e atividade metaloexopeptidase		A0A090L704
<i>AP complex**</i>	Ligação de e transporte intracelular de proteínas	Reticulo endoplasmático/ **Citoplasma	A0A090LLE4
<i>Alpha crystallin/Hsp20 domain**</i>	Proteína de choque térmico		A0A090LI16
<i>AMP deaminase</i>	Atividade catalítica e ligação de íons metálicos		A0A090LMK2
<i>Prolyl 4-hydroxylase alpha</i>	Ligação íons de ferro e ac. Ascórbico, atividade oxidoreductase		A0A090LGA8
<i>Lamin</i>	Função estrutural e regulação transcricional no núcleo celular	Citoesqueleto	A0A090MY81
<i>Domain BTB- POZ</i>	Transporte de íons		A0A090L5P4
<i>DOMON domain</i>	Envolvido no reconhecimento de açúcar		A0A090L8U1
<i>Alpha carbonic anhydrase</i>	Ligação íon zinco e atividade de carbonato desidratase		A0A090L375
<i>Glutamate decarboxylase</i>	Metabolismo	Outros	A0A090MXB6
<i>Dynamin</i>	Locomoção e reprodução		A0A090L5F6
<i>Zormin</i>	Resposta imunológica/estrutura muscular		A0A090KY20
<i>Synthase cistein</i>	Atividade catalítica		A0A090LJN9
<i>Vacuolar</i>	Regeneração		A0A090LL76
<i>Guanine nucleotide</i>	Diferentes processos		A0A090MY77
<i>EF-Hand domain</i>	Respiração celular e ligação de íons de cálcio	Relaxamento muscular	A0A090MYC4
<i>Isomerase</i>	Atividade catalítica		A0A090LNE6
<i>Insulin-degrading enzyme</i>	Ligação de íons metálicos e atividade metaloendopeptidase		A0A090L892
<i>Aminotransferase</i>	Atividade catalítica		A0A090KUT3
<i>Endopeptidase</i>	Atividade metaloendopeptidase	Enzimas	A0A090KU73
<i>Galactose oxidase</i>	Catalisa a oxidação da D-galactose		A0A090MMM6
<i>Metalloendopeptidase</i>	Degradação de proteína, ligação de íons de zinco		A0A090MN24
<i>Ureidopropionase</i>	Processo catabólico e biossintético		A0A090MZ08
<i>Amontillado</i>	Reprodução, locomoção e desenvolvimento	Componente celular	A0A090L4J5
<i>Uncharacterized protein</i>	Proteínas de domínio desconhecido	Não encontrado	A0A090L6T4, A0A090L468, A0A090L4S4

Tabela 2- Proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico da fêmea parasita (FP) de *S. venezuelensis*, identificadas na base de dados, agrupadas em categorias e localizadas de acordo com o Uniprot.

Grupo de Proteínas	Função	Localização	Nº de acesso
<i>Tubulin/ actin/ Protein bicaudal/ Kinesin/ EF-hand domain/ laminin/ Chd64</i>	Estrutural	Citoesqueleto	A0A090LGP8, A0A090LM73, A0A090KZQ8/ A0A090L926/ A0A090LSX7/ A0A090LQB2/ A0A090KZ25/ A0A090L0N4/ A0A090MZ81
<i>T-complex protein/ Vacuolar/ Prefoldin/ DnaJ homolog</i>	Enovelamento de proteínas		A0A090L566/ A0A090LG65/ A0A090LLB2/ A0A090LKW0
<i>Eukaryotic translation/ Golgi apparatus</i>	Síntese proteica		A0A090LK27, A0A090MUJ7, A0A090L9F6, A0A090LIJ9, A0A090LI02, A0A090KYT6, A0A090L7A4, A0A090LCC0, A0A090LIK2/ A0A090MP00, A0A090L8R1, A0A090MXF7 A0A090LE80, A0A090MNA9/ A0A090KXN8/ A0A090LHR5
<i>Ras-related/ Signal recognition*/ Tumour protein D52*</i> <i>Protein quaking</i>	Ligadora de ácido nucleico		A0A090LH00
<i>Ubiquitin/proteasome</i>	Proteólise		A0A090LHP6, A0A090MRZ4, A0A090LHD3, A0A090MSJ1, A0A090LFI3, A0A090LKK3, A0A090MZG4, A0A090L3B9, A0A090KWT9, A0A090MYV9, A0A090LE68, A0A090LE31 A0A090LKK3
<i>Si:dky-72g22.1</i>	Digestão de proteínas		A0A090L0R7, A0A090L744
<i>Translation Initiation factor</i>	Biossíntese de proteína		A0A090KV56/D2DS72, O97367/A0A090LQ70/A0A090L8W3
<i>Dipeptidase/Aspartic protease/Histidine/Phosphomannomutase</i>	Atividade enzimática		A0A090MW97
<i>Inosine</i>	Replicação DNA		A0A090L934, A0A090LJK4, A0A090LG27, A0A090KUL1, A0A090LEE7/ A0A090L3Y6
<i>Coatomer/ LD39266p*</i>	Proteína de transporte intracelular		A0A090KY03
<i>ATPase inhibitor</i>	Regulação do ATP		A0A090L7U0
<i>Mitochondrial trifunctional</i>	Oxidação de Ácidos graxos		A0A090KWX5, A0A090LNC6
<i>ATPase complex mitochondrial</i>	Transferência de íons		A0A090L4R8
<i>Transcription factor BTF3</i>	Embrionamento do ovo		A0A090L880/ A0A090LEP1
<i>Anamorsin/ Cytochrome c oxidase</i>	Respiração celular		A0A090L413
<i>GrpE protein</i>	Enovelamento de proteínas		A0A090LGV9, A0A090N0Z5
<i>Phosphate carrier protein mitochondrial</i>	Transportador de fosfato mitocondrial		A0A090LKH4
<i>Electron transfer flavoprotein</i>	Transferência de elétron	Citoplasma/ Reticulo endoplasmático*	F1DI05, A0A090L248, A0A090L8H8, A0A090MPA0
<i>Heat shock</i>	Resposta ao estresse e choque térmico		A0A090L213, A0A090LEJ8, A0A090LS76, A0A090LKT9,
<i>Protein lethal</i>	Ligação de íons metálicos		A0A090L4J6, A0A090MVA0, A0A090KQX3, A0A090MVQ8, A0A090KSE7/ A0A090L9R1 A0A090LFU7
<i>ADP/ ATP translocase ribosylation factor</i>	Respiração		A0A090KYL3/ A0A090LUZ9
<i>Galactosidase</i>	Atividade catalítica		A0A090MYP9
<i>Phospholipase/ Saposin</i>	Metabolismo lipídico		A0A090LLR9
<i>Prohibitin</i>	Reprodução, ovoposição		A0A090L025
<i>B-Cell receptor*</i>	Transporte interno de proteínas		
<i>UDP-glucose*</i>	Desenvolvimento do nematodeo		
			A0A090LBM7, A0A090LKM3, A0A090L626, A0A090MXX6, A0A090L910, A0A090L5S7, A0N0S1, A0A090L4X4, A0A090L6W1, A0A090LHE1, A0A090LB40, A0A090LEZ7, A1BQ87, A0N0S2, A0A090L194, A0A090LA06, A0N0S4, A0A090L6U2, A0A090L9V3, A0A090L7Z1, B5B1G1, A0A090LJG7, A0A090LJX8, A0A090L7H3, A0A090LE67, A0A090L7G7, H6ABW9, A0A090MXR1, A0A090LD65, A0A090KYF8, A0A090L254, A0A090L8P0, A0A090LEL1, A0A090LL08, A0A090L2D6, A0A090LAH1, A0A090LBF0, A0A090LC84, A0A090KUV5, A0A090L5U3, A0A090LC01, A0A090LUD6, A0A090LF47, H6ABW8, A0A090MW08, A0A090LFF8
<i>kinase/ Casein kinase II subunit beta</i>	Ligação de ATP		A0A090LTS3, A0A090MVV2
<i>Histone</i>	Heterodimerização de proteínas		A0A090LFB9, A0A090L441, A0A090L9U7
<i>Ribonucleo protein</i>	Biossíntese de ribossomo		A0A090L9W1
<i>Exportin-1</i>	Transporte interno de proteínas	Núcleo	A0A090MW64
<i>Ribonuclease</i>	Catalisa a degradação do RNA		A0A090LAA1
<i>DNA-directed RNA polymerases / U6 snRNA/ Protein dpy-30/ Exonuclease</i>	Síntese de proteína		A0A090LE29/ A0A090LBT2/ A0A090LHL0/ A0A090MSE6

Continua

<i>Karst</i>	Desenvolvimento larval, reprodução		A0A090MUS8
<i>Pasilla</i>			A0A090KY69
<i>Ribonucleoprotein</i>	Ligação de Ácido nucleico		A0A090LF89
<i>Egalitarian exonuclease</i>			A0A090KPP9
<i>Piwi-like protein</i>			A0A090KX02, A0A090KWJ6
<i>Protein mago nashi</i>	Regulação <i>splicing</i> RNA		A0A090LJM1
<i>Helicase</i>	Ligação de Ácido nucleico		A0A090MWW1, A0A090LJN8, A0A090MY70
<i>MD-2-Related lipid-recognition</i>	Domínio lipídico de reconhecimento		A0A090KWB7
<i>Receptor expression-enhancing</i>	Receptor de membrana		A0A090L6Y9
<i>Legume-like</i>	Ligação de carboidrato		A0A090KWW3
<i>Zinc finger RING-type</i>	Transcrição, Ligação de metal	Membrana celular/ Extracelular**	A0A090L1Q1
<i>BcDNA. GH10229</i>	Componente de membrana		A0A090MYK8
<i>Zona pellucida</i>	Reprodução		A0A090MYJ4
<i>Protein transport</i>	Transporte de proteínas		A0A090LIG3
<i>Transthyretin-like**</i>	Atividade oxidoreductase		A0A090KX88, A0A090L5F2, A0A090MZE2
<i>Chitin binding**</i>	Ligação quitina		A0A090LMM0
<i>Nascent polypeptide</i>	Síntese de proteína		A0A090LKH2
<i>Thioredoxin</i>	Regulação da homeostase redox celular		A0A090L4S5
<i>Small nuclear ribonucleo protein</i>	Envolvida excisão de íntrons		A0A090LFU9
<i>AT21416p ligadora ion ca</i>	Ligação de GTP		A0A090LNU3
<i>Serine/threonine protein</i>	Desenvolvimento do ovo/larva		A0A090KQ69
<i>LD20211p</i>	Degrada RNA		A0A090KV75
<i>Nuclear migration</i>	Desenvolvimento embrionário	Outros locais	A0A090L9N7
<i>Proliferação</i>	Regulação do crescimento		A0A090LL67
<i>Protein NipSnap</i>	Regulação da transcrição		A0A090LLY8
<i>Hydrolase</i>	Regulação da locomoção e co-fator		A0A090LS86, A0A090MWZ6
<i>Reductase</i>	Homeostase redox celular		A0A090L067
<i>Diphosphate reductase Cytosol</i>	Atividade oxidoreductase		A0A090LR29
<i>Cathepsin D</i>	Atividade endopeptidase aspártica		A0A090LHQ7
<i>Nematode fatty acid retinoid</i>	Ligação lipídica		A0A090LEQ2
<i>Dehydrogenase</i>			A0A090MWW7, A0A090LG30, A0A090LPS0, A0A090LAK1, A0A090LME5, A0A090L7Z3, A0A090MUZ1, A0A090KXI8, A0A090MYZ5, A0A090LJ56
<i>Peroxisredoxin-6/ F104781p/ Nucleoside phosphorylase/ Crotonase/ Carbonic anhydrase</i>	Atividade enzimática	Enzimas	A0A090MTV8/A0A090LQ23/ A0A090LJU4/ A0A090L876/ A0A090LV46
<i>Synthetase/ Transferase</i>			A0A090MZX0, A0A090L7X6, A0A090L8U7, A0A090LIU0, A0A090KQS7/ A0A090L4K9, A0A090LNM6, A0A090KU32, A0A090LHW6
<i>Synthase/ tRNA ligase/ Hydratase</i>			A0A090L510, A0A090MZ28, A0A090L7J5/ A0A090LII3, A0A090L2C7, A0A090MYI5/ A0A090L9Y8
<i>Uncharacterized protein</i>	Sem função	Não encontrado	A0A090L403, A0A090L634, A0A090KXW0, A0A090LIB9, A0A090L1X3, A0A090MU17, A0A090L2P8
			A0A090LFY0, A0A090L7A5, A0A090L9Q2, A0A090LDY6, A0A090L8Y2, A0A090MSS6.

4.2.2 Análise das proteínas identificadas na larva L3 de *S. venezuelensis* para fins de diagnóstico

Sabendo-se da importância da larva L3, como fonte de antígeno heterólogo para o diagnóstico da estrogiloidíase humana, as proteínas identificadas no extrato de L3 foram submetidas ao banco de dados disponibilizado por Hunt *et al.*¹⁰⁰, tomando como base a espécie *S. venezuelensis*. E nessa abordagem foram identificadas 857

proteínas na L3. A frequência acumulativa dentro do extrato de L3 revelou que 82 constituintes contribuem para 50% do total da massa (Gráfico 4).

Gráfico 4- Distribuição de proteínas no extrato de larva infectante (L3) de *S. venezuelensis*. Frequência acumulada no extrato revelou que 82 constituintes contribuem para 50% da massa total.

Entre as 82 proteínas que correspondem à metade da massa total do extrato protéico, a actina aparece em maior proporção, seguida por diferentes grupos de enzimas, particularmente kinases (*arginine, nucleoside diphosphate, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate and phosphoglycerate*); desidrogenases (*malate, glyceraldehyde-3-phosphate and retinal dehydrogenase 2*); isomerases (*Triosephosphate, protein disulfide, peptidyl prolyl and glucose 6 phosphate*), aminotransferases (*aspartate, alanine aminotransferase 1, 4-aminobutyrate*); aldolase (*fructose biphosphate*) e sintases (*citrate, ATP synthase subunit beta, hematopoietic prostaglandin D*). Adicionalmente, foram identificadas as

proteínas com domínio CAP, profilina, proteína zeta 14-3-3, nucleoredoxin 2, calmodulina, superóxido dismutase, enolase, ferritina e proteínas de choque térmico (HSP60 e HSP70). Outras proteínas foram identificadas em menores quantidades, incluindo quatro galectinas, duas metaloproteases e cinco catepsinas. Além de grande número de proteínas não categorizadas dentro do Uniprot.

De acordo com a função molecular segundo *Blast2go*, as maiores contagens de proteínas identificadas foram relacionadas com: atividade enzimática de oxirredutase (101), ligação de cofator (80), ligação de proteínas (61) e ligação de coenzima (58) (Gráfico 5).

Gráfico 5- Função molecular segundo o *Gene Ontology* das proteínas identificadas no extrato proteico de larva infectante (L3) de *S. venezuelensis*.

4.2.3 Busca pelo “*SignalP*” e domínio transmembrana

Foi realizada a análise de predição de peptídeo sinal (*SignalP*-5.0) e de domínio transmembrana (*TMHMM Server* v.2.0). A análise de predição de *SignalP* mostrou que 87 (9,7% do total) proteínas identificadas apresentaram apenas peptídeo sinal, sendo consideradas secretadas. Entre elas, destacam-se as catepsinas B, D, Z e L.1; uma metaloendopeptidase e duas proteínas contendo domínio CAP. Ao considerar apenas a análise *TMHMM*, 42 (4,7%) identidades foram categorizadas como proteínas transmembranares, como: peptidil-prolil isomerase, inibidor de metaloproteinase tag-225, antígeno CD09, citocromo b5, laminina subunidade alfa-2 e algumas fosfatases e oxidases. Algumas proteínas resultaram positivas para as análises *SignalP* e *TMHMM*, entre as quais podemos listar as metaloproteases, laminina subunidade α -5, proteínas contendo domínio CAP e proteínas peptidil-prolil isomerase. Das cinco galectinas identificadas, apenas uma possui o domínio *HTMM* (Tabela 3).

Tabela 3- Proteínas identificadas no estágio de larva filarioide (L3) de *S. venezuelensis* segundo o critério do peptídeo sinal (*SignalP*) e domínio transmembrana (*HTMM*).

Número de identificação	Proteínas	SignalP	THMM
A0A0K0FX99; A0A0K0F4S7; A0A0K0FXA8	CAP domain-containing protein	Sim	Sim
A0A0K0FK38	Peptidyl-prolyl isomerase	Sim	Sim
A0A0K0F873	Peptidyl-prolylcis-trans isomerase	Sim	Sim
A0A0K0F247	Prolylendopeptidase	Sim	Sim
A0A0K0F0S4; A0A0K0F0S5; A0A0K0F0Q1; A0A0K0FEF7	Zinc metalloproteinase	Sim	Sim
A0A0K0FR91	Matrix metalloproteinase	Sim	Sim
A0A0K0FMW6	Esterase 1	Sim	Sim
A0A0K0G155	ERGIC-53 protein	Sim	Sim
A0A0K0G540	Glycoprotein 93	Sim	Sim
A0A0K0F9M1	Putative acid phosphatase 5	Sim	Sim
A0A0K0F7N6	Alpha-5 laminin subunit	Sim	Sim
A0A0K0F2Q9	Hypoxia up-regulated protein 1	Sim	Sim
A0A0K0G297	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	Sim	Sim
A0A0K0G1H2	Protein subunit associated with translocon-	Sim	Sim
A0A0K0FG20	Golgi apparatus protein 1 counterpart	Sim	Sim
A0A0K0EZE2	Putative protein similar to tyrosinase tyr-1	Sim	Sim
	Uncharacterized protein OS = <i>S. venezuelensis</i> (n = 29)	Sim	Sim
A0A0K0FJA1; A0A0K0G1T0	CAP domain-containing protein	Sim	Não
A0A0K0F8J4	Protein disulfide-isomerase	Sim	Não
A0A0K0FC49	Protein disulfide-isomerase	Sim	Não
A0A0K0F1T4	Calreticulin	Sim	Não
A0A0K0FH97	Glutathione peroxidase	Sim	Não
A0A0K0F436	Calumenin type protein	Sim	Não
A0A0K0FAQ1	Papillin	Sim	Não
A0A0K0F9P2	Carboxypeptidase	Sim	Não
A0A0K0E2T5	Heat shock 70 kDa protein 1A / 1B	Sim	Não
A0A0K0FAI6	Ribosomal protein Ubiquitin-60S L40	Sim	Não
A0A0K0F179	Alpha-galactosidase	Sim	Não
A0A0K0FNN1	Heat shock 70 kDa protein 1A / 1B	Sim	Não
A0A0K0FJP3	Cathepsin Z	Sim	Não
A0A0K0EVN0	Cathepsin D	Sim	Não
A0A0K0FPY0	Cathepsin B	Sim	Não
A0A0K0F6L7	Cathepsin L.1	Sim	Não
A0A0K0F8R4	Cathepsin Z	Sim	Não
A0A0K0FMK9	Serine carboxypeptidase inducible for retinoids	Sim	Não
A0A0K0F2S4	CarboxypeptidaseLysosomalPro-X	Sim	Não
A0A0K0EX76	Calmodulin-like protein 3	Sim	Não
A0A0K0F195	Poly (U) specific endoribonuclease homolog	Sim	Não
A0A0K0FYNO	Cystatin	Sim	Não
A0A0K0EYJ6	Protein similar to Transtirretin 5	Sim	Não
A0A0K0EXY7	Calsequestrina	Sim	Não
A0A0K0G0D5	Glucosidase 2 betas subunits	Sim	Não
A0A0K0FUL3	Superoxidodismutation	Sim	Não
A0A0K0EWQ2	Galectin	Sim	Não
A0A0K0F7Q8	Alpha neutral glycosidase AB	Sim	Não
A0A0K0EZB8	Beta tubulin chain	Sim	Não
A0A0K0FJP0	Eyes shut	Sim	Não
A0A0K0G479	CD109 antigen	Sim	Não
A0A0K0G2I5	Myotactin A	Sim	Não
A0A0K0F9F8	MUP-4 transmembrane matrix receive	Sim	Não
A0A0K0F3X2	Laminin beta-1 subunit	Sim	Não
A0A0K0FVD6	Legumain	Sim	Não
A0A0K0FZF9	Protein resident in the endoplasmic reticulum 44	Sim	Não
A0A0K0EZ99	No potential mechanoreceptor A	Sim	Não
A0A0K0FWR6	PhospholipaseB-like	Sim	Não
A0A0K0FXP6	MANF / CDNF-like protein	Sim	Não
A0A0K0EY42	Metaloendopeptidase	Sim	Não
A0A0K0F4K2	Alcoholic dehydrogenase [NADP (+)]	Sim	Não
A0A0K0FNY0	Protein suppressor / enhancer lin-12 9	Sim	Não
A0A0K0FKR5	Acid sphingomyelinase type phosphodiesterase	Sim	Não
A0A0K0F0R8	Properdin	Sim	Não
A0A0K0FYA1	Peptidyl prolyl isomerase	Sim	Não
A0A0K0F0L1	Sodium / calcium exchanger 2	Sim	Não
A0A0K0EZE6	Protein disulfide-isomerase	Sim	Não
A0A0K0F6T7	Alpha-2 (IV) collagen chain	Sim	Não
A0A0K0FWR6	B-like phospholipase	Sim	Não
A0A0K0FXP6	MANF / CDNF-like protein	Sim	Não
	Uncharacterized protein OS = <i>Strongyloides venezuelensis</i> (n = 44)	Sim	Não
A0A0K0EWZ9	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	Não	Sim
A0A0K0F1K0	Putative metalloproteinase-225 inhibitor	Não	Sim
A0A0K0FXH2	Eukaryotic translation initiation factor 5A	Não	Sim
A0A0K0EUG2	Beta subunit of electroprotein transfer	Não	Sim

Continua

A0A0K0FTY1	Isoenzyme adenylate kinase 1	Não	Sim
A0A0K0EZA1	sperm protein	Não	Sim
A0A0K0F3R5	Poly (U) specific endoribonuclease	Não	Sim
A0A0K0F8Q4	Adenine phosphoribosyltransferase	Não	Sim
A0A0K0G0W9	Putative pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	Não	Sim
A0A0K0G1X4	Ras-related protein, Ral-a	Não	Sim
A0A0K0FZR7	CAP domain-containing protein	Não	Sim
A0A0K0FDW3	CAP domain-containing protein	Não	Sim
A0A0K0F6B8	Regulatory subunit of protein phosphatase 1 7	Não	Sim
A0A0K0FUH2	Syntaxin-1A homol	Não	Sim
A0A0K0FXP4	UPF0587 protein	Não	Sim
A0A0K0FYK0	Cytochrome b5	Não	Sim
A0A0K0G480	CD109 antigen	Não	Sim
A0A0K0F9P0	BcDNA.GH10229	Não	Sim
A0A0K0FN87	Sulfite oxidase, mitochondrial	Não	Sim
A0A0K0F5C4	Alpha-2 laminin subunit	Não	Sim
A0A0K0EZ68	NADPH - cytochrome P450 reductase	Não	Sim
A0A0K0FA56	Ribonucleoside diphosphate reductase	Não	Sim
A0A0K0FEV9	Biosynthesis of monosaccharides of Ubiquinone COQ6, mitochondrial	Não	Sim
A0A0K0FZ52	CTP synthase	Não	Sim
	Uncharacterized protein OS = <i>Strongyloides venezuelensis</i> (n = 18)	Não	Sim

Foi realizada também a busca de domínios nas 93 proteínas não categorizadas no Uniprot, consideradas positivas por *SignalP*, *TMHMM* ou ambos critérios (Gráfico 6). Pode-se identificar 31 diferentes domínios proteicos: proteína de ligação a ácido graxos (8 identidades; 7 *SignalP* + / 1 ambos +), proteína de ligação de zinco (7 identidades; 3 *SignalP* + / 3 *TMHMM*+ / 1 ambos +), transtiretina (7 identidades; 4 ambos+ / 3 *SignalP*+), *coiled coil cuticle* (6 identidades; todas *TMHMM* +), MOLO1 (receptor de acetilcolina) (4 identidades; 2 ambos + / 2 *SignalP*+), EGF-like (4 identidades; 3 ambos + / 1 *SignalP*+), inibidor do tipo BPTI Kunitz (4 identidades; 3 *SignalP*+ / 1 ambos +) e *lisosyme like* (3 identidades; todas *SignalP*+).

Gráfico 6- Domínios das proteínas não categorizadas no extrato de L3 de *S. venezuelensis*, consideradas positivas por *SignalP-TMHMM* ou ambas as análises, utilizando o Uniprot.

4.3 Infecção experimental

4.3.1 Cinética da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG)

Para a avaliação da carga parasitária realizou-se a cinética de eliminação de ovos de *S. venezuelensis* diariamente do 1º até 35º d.p.i. (Gráfico 7). Pode-se observar que o início da eliminação de ovos nas amostras fecais ocorreu a partir do 5º d.p.i., com maior quantidade no 8º d.p.i. A partir do 13º d.p.i. iniciou a redução na eliminação dos ovos ocorrendo uma discreta variação até o 35º d.p.i.

Gráfico 7- Cinética de ovos por grama de fezes (OPG) nas fezes dos animais individualizados infectados com *S. venezuelensis* nos diferentes dias pós-infecção (d.p.i.).

Considerando a média de ovos liberados nos cinco animais em cada ponto de coleta da amostra de fezes, pode-se observar que $20.020 \pm 4.634,9$ (7º d.p.i.), seguido por $3.420 \pm 928,4$ (14º d.p.i.), $2.310 \pm 607,7$ (21º d.p.i.), $290 \pm 108,4$ (28º d.p.i.) e $170 \pm 120,4$ (35º d.p.i.), não houve diferença significativa. A contagem de ovos demonstrou a evolução da infecção experimental, caracterizando a fase aguda pela grande eliminação

de ovos nas fezes (6º a 14º d.p.i.) e a fase de recuperação pela redução no número de ovos (30º a 35º d.p.i.).

4.3.2 Western-blotting e ELISA

Inicialmente foi observado o reconhecimento de diferentes frações imunogênicas no extrato proteico de L3 pelo “pool” das amostras de soros dos animais infectados experimentalmente. O padrão de reconhecimento está representado na Figura 5.

Figura 5- Reconhecimento de bandas antigênicas no extrato proteico de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis* por soros de ratos infectados experimentalmente 7º, 14º, 21º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.), e controle negativo (CN).

É importante notar que bandas não específicas (~140kDa) foram reconhecidas pelos soros de controle negativo. Ocorreu o reconhecimento de bandas (~70-65kDa) na fase de recuperação, e a região de 40-30kDa foi reconhecida nas fases aguda e de recuperação da infecção. Observa-se maior intensidade de marcação das bandas

reconhecidas ao longo da infecção.

Visando a identificação de frações mais específicas o extrato proteico da larva filarioide (SL3) foi purificada em coluna α -Lactose agarose para isolamento de galectinas. Foi utilizado 10-20mg de extrato proteico de L3. Após a eluição foi obtido 2,6mg/mL e 0,4mg/mL, de fração não ligada (FNL) e ligada (FL), respectivamente. Pode-se observar que ocorreu a purificação da fração de galectina, utilizando anticorpo específico (anti-galectina) (Figura 6).

Figura 6- SDS-PAGE 12% do extrato de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis*, submetida coluna de α -lactose agarose fração não- ligada (FNL) e ligada (FL) corado com nitrato de prata, e *Western- blotting* utilizando anticorpo específico para galectina revelado por substrato quimioluminescente (WB).

Em seguida foi realizado o teste ELISA utilizando as frações antigênicas: solúvel (L3), fração não ligada (FNL) e ligada (FL). Pode-se observar o aumento da detecção de anticorpos IgG específicos durante o curso da infecção (Gráfico 8). Considerando a variação individual pode-se verificar que as frações antigênicas possuem perfis

diferentes de reconhecimento, com aumento e redução na detecção de anticorpos, especialmente nas frações solúvel e não ligada (Gráfico 8A e B).

A positividade foi de 100% no extrato proteico de L3 total para todos os dias, exceto em 7^o d.p.i. (80%, com um rato negativo). A positividade foi de 100% no extrato proteico. É importante notar que a fração de galectina foi reconhecida por anticorpos de 3 ratos, com positividade de 60%. A positividade na fração não ligada foi similar à fração de galectina, em 7^o e 14^o d.p.i., porém com aumento nos valores de densidade óptica a partir do 21^o d.p.i. (Gráfico 8B). Os valores de densidade óptica para a fração de galectina permaneceram constantes, sem elevação ou redução ao longo da infecção (Gráfico 8C).

Gráfico 8- Detecção de anticorpos IgG anti- *Strongyloides* em amostras de soro de animais individualizados infectados com *S. venezuelensis* por ELISA utilizando o extrato proteico de larva filarioide (A), fração ligada (B) e fração não ligada (C).

Considerando a variação individual e o reconhecimento diferencial nas frações antigênicas (Gráfico 8A, B e C), pode-se observar que houve diferença estatística entre os ratos ao longo da infecção. O rato 1 apresentou um reconhecimento diferencial em relação aos ratos 3 e 5 (extrato de L3 total e na fração ligada), e em relação aos ratos 2, 3 e 5 (fração não ligada).

Realizando a avaliação agrupada das amostras de soros dos animais infectados em relação aos não infectados, ao longo da infecção experimental (Gráfico 9). Pode-se observar que ocorreu um aumento na produção de anticorpos IgG até o 21ºd.p.i., seguido pela redução no 35ºd.p.i. utilizando o extrato solúvel (9A), o mesmo não ocorreu com a fração purificada (9B) e não purificada (9C).

Gráfico 9- Detecção de anticorpos IgG anti- *Strongyloides* em amostras de soro de animais agrupados infectados com *S. venezuelensis* por ELISA utilizando o extrato proteico de larva filarioide (A), a fração ligada (B) e fração não ligada (C). *, **, ***, ****p<0,001 e p<0,005.

5 DISCUSSÃO

Diversas lacunas existem no contexto da estrogiloidíase, sejam questões envolvendo a relação parasito-hospedeiro ou questões envolvendo o diagnóstico. Assim nosso grupo tem focado na espécie *S. venezuelensis*. No presente estudo, foi explorada a análise proteômica por *Shotgun*, como ferramenta para a identificação de proteínas nos estágios de L3 e PF de *S. venezuelensis*. Além disso, foi avaliado ao longo da infecção experimental com *S. venezuelensis* o extrato proteico de L3 total e purificado.

5.1 Análise quantitativa nos estágios de L3 e FP de *S. venezuelensis*

Sabendo-se da importância das proteínas para o entendimento de qualquer organismo, iniciamos o nosso estudo com a análise proteômica. Poucos dados proteômicos foram publicados até o presente momento considerando o gênero *Strongyloides*^{74,77,79}. Vale ressaltar que nenhum destes estudos utilizou a proteômica por *Shotgun* para a descrição de proteínas presentes em diferentes de estágios evolutivos de *S. venezuelensis*. No presente estudo foi identificado um total de 1017 proteínas no extrato proteico, considerando os dois estágios evolutivos, sendo 686 proteínas identificadas na L3 e 835 proteínas na FP.

Baseando-se na comparação entre os estágios evolutivos, pode-se verificar que determinadas proteínas foram mais abundantes em um estágio que o outro, sendo 56 proteínas diferencialmente expressas na L3 e 227 na FP. A análise da função molecular pelo *Gene Ontology* revelou que muitas dessas proteínas estão envolvidas em diferentes processos celulares, como metabolismo, estresse, manutenção estrutural, resposta imune e sinalização. Dentro de uma perspectiva biológica, o sucesso de um parasita é dependente na habilidade de adaptação ao ambiente

interno do hospedeiro¹⁰². A invasão do hospedeiro e a migração tecidual de vários helmintos têm sido associadas à expressão e liberação de proteases derivadas de parasitas. Proteases tais como metaloproteases degradam as proteínas da matriz extracelular e podem estar envolvidas na degradação dos tecidos do hospedeiro¹⁰³. Algumas dessas proteínas foram identificadas tanto no estágio de L3 e FP. Sabe-se que as proteinases são importantes componentes da relação parasito-hospedeiro e constituem uma proporção significativa de genes com regulação positiva no estágio de fêmeas parasitas de *S. ratti* e *S. stercoralis*⁹³.

A cutícula constitui a cobertura externa essencial para o crescimento, movimento e sobrevivência de nematódeos¹⁰⁴. Não surpreendentemente, as proteínas estruturais como a actina foram proteínas abundantes nos dois estágios de *S. venezuelensis*. Essas proteínas podem desempenhar importante papel na manutenção da forma corporal e integridade muscular de nematoides^{104,105}. A actina possui várias funções vitais, principalmente em processos celulares, como suporte mecânico, geração de força contrátil, locomoção e divisão celular^{105,106}.

Acrescenta-se as proteínas *nematode cuticle collagen* e *nematode fatty acid retinoid*, como constituintes específicos dentro do grupo dos nematodeos. A identificação destas proteínas pode sugerir um papel fundamental na interação com hospedeiro. Maeda *et al.*⁷⁹, descreveram *nematode fatty acid retinoid* como produtos secreção/excreção dos estágios parasitos de *S. venezuelensis*. A identificação de *nematode cuticle collagen* como constituinte diferencialmente expresso na L3, pode indicar o processo de muda que os estágios larvários sofrem durante o crescimento, onde a cutícula protetora é sucessivamente eliminada e re-sintetizada até o desenvolvimento completo em verme adulto.

Os genes ribossômicos são conservados e altamente expressos em eucariotos¹⁰⁷. Confirmando esta observação, proteínas ribossomais foram identificadas em grande quantidade no extrato de FP, em contrapartida em pequena

proporção no extrato de L3. Fato que pode indicar uma maior síntese proteica da FP, uma vez que este estágio evolutivo está relacionado com a reprodução e manutenção da infecção no hospedeiro.

Pode-se também destacar a presença de proteínas envolvidas com a reprodução, formação e desenvolvimento do ovo no estágio de FP, como *prohibitin*, *nuclear migration*, *zona pellucia*. A *prohibitin* é uma proteína multifuncional, altamente conservada¹⁰⁸, e relacionada com diversos processos celulares, incluindo regulação do ciclo celular, regulação transcricional nuclear, sinalização celular, senescência, apoptose e na biogênese mitocondrial¹⁰⁹. Sabe-se que proteínas com domínio *zona pellucia* possuem diferentes funções, que variam desde receptores a estruturais e mecânicos, como componentes estruturais de ovos e de larvas de nematodeos¹¹⁰.

Acrescenta-se *proliferation-associated protein* e *hidrolases* presentes no extrato de FP, as quais podem ser associadas à regulação do crescimento e de locomoção das FP. A transição do estágio larval de vida livre para o estilo de vida parasitário em um hospedeiro representa um período de grande estresse aos parasitas, como resultante de dramáticas mudanças ambientais¹¹¹. Sabe-se que a expressão das HSPs (*Heat shock protein*) em nematódeos pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos, como mudanças de temperatura e estresse oxidativo¹¹². Neste contexto, as HSPs encontradas em parasitos podem estar envolvidas na interação parasita-hospedeiro¹¹³. No presente estudo, HSP17 e HSP90, foram identificadas dentre as proteínas diferencialmente expressas no extrato de FP. Estudos recentes têm demonstrado a presença de HSPs em transcritos de *S. venezuelensis*¹¹⁴ e em produtos de secreção/excreção nos estágios de larva infectante, fêmea parasita e de vida-livre de *S. ratti*⁷⁷. Estas proteínas em *Strongyloides* tem sido relacionada com a interação e ativação das células hospedeiras, auxiliando na liberação de fêmeas parasitas no intestino e na produção de anticorpos¹¹⁵. Isto pode justificar as HSPs entre as proteínas diferencialmente expressas nas FP.

Acrescenta-se nas proteínas diferencialmente expressas na FP, além das HSPs, as proteínas reativas de oxigênio (*peroxiredoxin*, *thioredoxin*), as *transthyretin-like*, as quais também estão relacionadas com a manutenção da homeostase celular. Tem sido proposto que membros da família das *transthyretin-like* possam estar envolvidos na sobrevivência e no desenvolvimento dos nematódeos dentro do hospedeiro¹¹⁶. Da mesma forma as proteínas reativas de oxigênio são essenciais para o entendimento de como os nematodeos parasitos lidam com o estresse oxidativo do ambiente interno e externo¹¹⁷. Enzimas antioxidantes secretadas por helmintos, como a superóxido dismutase podem atuar como proteção da resposta imune inata do hospedeiro¹¹⁷, favorecendo a sobrevivência do parasito. Segundo Maeda *et al.*⁷⁹ isso pode refletir estratégias de parasitismo utilizadas por *S. venezuelensis*.

As galectinas constituem membros da família das *C-type lectin*, caracterizadas pelo domínio de reconhecimento de carboidratos¹¹⁸. A função biológica das galectinas nos nematodeos não é bem compreendida, mas tem sido relacionada à sobrevivência do parasita e na interação com o hospedeiro, bem como à regulação negativa da imunidade inata do hospedeiro¹¹⁹. As galectinas foram diferencialmente expressas no extrato de L3, podendo indicar uma interação precoce do parasito, uma vez que este estágio constitui o primeiro contato do parasito com o hospedeiro. As galectinas tem sido identificadas nos produtos de secreção/excreção de vários nematodeos parasitas, como *Brugia malayi*¹²⁰, *Ancylostoma caninum*¹²¹ e *S. ratti*⁷⁷.

Várias outras famílias de genes e proteínas, incluindo acetilcolinesterases e inibidores de proteinase (inibidores de tripsina e cistatinas), também são comumente reguladas no proteoma e no transcriptoma da fêmea parasita, sugerindo que essas proteínas também possam ter um papel no parasitismo em *Strongyloides*⁹³.

Em síntese, pode-se observar que as proteínas coletivamente identificadas na L3 estão relacionadas com a sua intensa atividade motora e invasiva, em contrapartida, na FP as proteínas estão relacionadas com a intensa síntese proteica,

além de compostos proteicos envolvidos na reprodução. Neste contexto, os presentes resultados complementam a literatura na identificação de proteínas nos estágios de L3 e FP.

5.2. Análise quantitativa no estágio de L3 de *S. venezuelensis* para fins diagnósticos

O proteoma total do estágio L3 de *S. venezuelensis* ainda não foi explorado, especialmente no contexto de novos alvos para o diagnóstico. Considerando os bons resultados de sensibilidade e especificidade do antígeno heterólogo para o diagnóstico de estrogiloidíase humana, principalmente da L3 de *S. venezuelensis*, foi avaliado o conjunto de proteínas neste estágio evolutivo. Recentemente Maeda *et al.*⁷⁹, avaliaram o secretoma de L3 e FP de *S. venezuelensis* e demonstraram proteínas solúveis e insolúveis envolvidas no parasitismo.

Considerando a aplicação no diagnóstico proteínas estruturais, como as actina, miosina, etc, embora estejam entre os componentes abundantes no extrato de L3, não podem ser consideradas como bons marcadores de diagnóstico, principalmente pela alta similaridade entre os organismos. Embora o nosso grupo tenha demonstrado o reconhecimento de proteínas estruturais por anticorpos IgG presentes em pacientes com estrogiloidíase^{76,122}, acreditamos na necessidade de estudos adicionais. O número total de proteínas identificadas no extrato solúvel de L3 *S. venezuelensis* reforça a intensa atividade de adaptação deste estágio evolutivo dentro do hospedeiro. As larvas filarioides com penetração ativa na pele ou na mucosa migram através do corpo do hospedeiro e atingem o intestino delgado¹⁶. Isso pode explicar a grande quantidade de enzima, que compõe metade da massa total do extrato de proteína. Cinco kinases foram identificadas como componente

abundante no extrato proteico. Sabe-se que as enzimas kinases afetam uma variedade de processos de sinalização celular¹¹⁷ e representam uma classe potencialmente nova de alvos terapêuticos para o tratamento de doenças parasitárias, como as infecções por *Schistosoma*¹²³. Enzimas kinases foram descritas em produtos de secreção/excreção de *Trichinella pseudospiralis*, e podem constituir marcadores diagnóstico na infecção experimental¹²⁴.

As enzimas da via glicolítica têm sido relacionadas em diversos processos biológicos e fisiopatológicos de diversas infecções parasitárias, como motilidade, adesão, invasão, diferenciação e desenvolvimento¹²⁵. A invasão do hospedeiro e a migração tecidual de vários helmintos têm sido associadas às proteases, como as metaloproteases derivadas de parasitas. Essas proteínas foram identificadas dentro do gênero *Strongyloides*^{77,93}. No presente estudo, dentre as proteínas mais abundantes na L3 pode-se destacar as metaloproteases. As metaloproteases tem sido descritas nos extratos somáticos de *S. stercoralis*¹²⁶, incluindo uma metaloproteinase de 40kDa conhecida como *strongylastacin*, pertencente à família das astacinas, as metaloproteases ligadoras de zinco¹²⁷. Estas proteínas são essenciais para a migração e invasão do hospedeiro por diferentes nematodeos parasitas, e foram descritas como um componente de secreção/excreção de *S. venezuelensis*⁷⁹. Além disso são imunogênicas na estrogiloidíase¹²² e angiostrongilíase¹²⁸. Recentemente, Varatharajalu *et al*¹²⁹ demonstraram que a *strongylastacin* constitui os produtos de secreção/excreção por *S. stercoralis*, estimulando anticorpos IgE específicos em humanos infectados por este helminto.

As catepsinas podem ser também destacadas dentre as proteases identificadas no extrato de L3. As catepsinas estão envolvidas em diferentes atividades proteolíticas de helmintos, auxiliando no processo de penetração e na intensa migração das larvas filarioides para o organismo hospedeiro¹¹⁷. Em diferentes nematodeos, tem sido relacionada ao processo de muda, como nas filariais (*B.*

malayi, *O. volvulus*)¹³⁰ e em *C. elegans*¹³¹, especialmente na digestão da cutícula antiga. As catepsinas identificadas no extrato de L3 de *S. venezuelensis* podem estar relacionadas a diferentes processos, como a atividade da carboxipeptidase e a cisteína proteinase, mas seu valor no diagnóstico de estrogiloidose permanece por ser evidenciado. No entanto, a catepsina B tem sido considerada como alvo promissor no diagnóstico da infecção por *Trichinella spiralis*¹³².

Proteínas de ligação ao retinol possuem função biológica relacionada as exigências metabólicas dos parasitos e ao possível controle do ambiente imune e inflamatório dos locais de tecido parasitados¹³³. Recentemente o potencial de aplicação de proteínas recombinantes ligadoras ao retinol e ácido graxo foram avaliadas no contexto do imunodiagnóstico da estrogiloidíase, demonstrando valores de sensibilidade e especificidade promissores¹³⁴.

As isomerases são enzimas chaves na glicólise, catalisando a isomerização reversível de diferentes moléculas¹³⁵. Triosefosfoisomerase e peptidil-prolisomerase foram identificados no proteoma de L3 *S. venezuelensis*, como constituintes abundantes. Estas proteínas foram identificadas nos componentes secreção/excreção de L3 e nas fêmeas partenogénica de *S. venezuelensis*⁷⁹. A identificação dessas proteínas pode sugerir que elas desempenham um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro. Proteínas com atividade enzimática do tipo peptidil-prolisomerase foram identificadas como antígenos imunodominantes reconhecidos por diferentes classes de imunoglobulinas durante a infecção por *Echinococcus granulosus*¹³⁶. No caso da estrogiloidíase o seu papel como marcador de diagnóstico ainda não foi avaliado.

Nesta nova abordagem, foi interessante observar as HSP60 e HSP70 como componentes abundantes no extrato de L3. Alguns estudos, apontam para um papel citoprotetor das HSP60 e HSP70, onde ocorre um aumento na expressão destas proteínas em larvas de primeiro estágio de *Trichinella spp.* quando submetidas a

mudança brusca de temperatura¹³⁷. Recentemente foi descrito a presença de HSPs em transcritos de *S. venezuelensis*¹¹⁴ e em produtos de secreção/excreção de *S. ratti*⁷⁷. Diversas famílias de HSPs recombinantes estão sendo utilizadas no imunodiagnóstico de protozooses, como: leishmanioses, tripanossomíase, toxoplasmose e malária¹³⁸. Mas no contexto do imunodiagnóstico da estrogiloidíase¹³⁹, destacam que as HSP60 como possíveis marcadores diagnósticos, principalmente por suas funções na resposta imune humoral e celular na infecção por *S. stercoralis*.

As proteínas codificadas no genoma nuclear são sintetizadas nos ribossomos e posteriormente transportadas para compartimentos subcelulares ou extracelulares específicos¹⁴⁰. Com o objetivo de identificar se determinada proteína presente em um determinado proteoma é ou não secretada, a predição de peptídeos de sinal (*SignalP*) constitui uma importante ferramenta na pesquisa proteômica. A busca por *SignalP* tem sido avaliada em diferentes organismos, incluindo nematódeos parasitas, como *Brugia malayi*¹⁴¹ e *Nippostrongylus brasiliensis*¹⁴².

A determinação de proteínas secretadas por helmintos pode auxiliar na identificação de novas ferramentas de diagnóstico¹⁰³. Com o objetivo maior compreensão do proteoma total de L3, foi realizada a análise de predição de peptídeo sinal e de domínio transmembrana. A presença do critério positivo para *SignalP* ocorreu em 9,7% de todas as proteínas identificadas, sendo consideradas secretadas. Pode-se verificar a grande quantidade de proteínas identificadas no Uniprot, que foram positivas para *SignalP*, domínio *THMMM* ou ambos. Algumas destas apresentaram-se em grande proporção no extrato de L3 (dentre as 82 proteínas mais abundantes), principalmente as diferentes proteinases. É interessante observar que nossos dados estão de acordo com os resultados da recente análise do secretoma de *S. venezuelensis*⁷⁹ e as observações resultantes dos produtos de secreção/excreção de *S. ratti*⁷⁷. Proteínas com domínios CAP foram identificadas no

extrato de L3, e podem estar associadas à migração larval e à evasão da resposta imune do hospedeiro¹⁴³. Os domínios CAP também foram encontrados associados a proteínas com atividade imunomoduladora^{144,93}. Estas proteínas foram identificadas em grande proporção nos produtos de secreção/excreção de algumas espécies de nematodeos^{143,103}, como o ancilostomídeo *Ancylostoma caninum*¹⁴⁵ e a filaria *Brugia malayi*¹⁴⁶. Proteínas que apresentam este domínio são constituídas de grande diversidade, algumas possuem domínio *HTMM*, *SignalP* ou ambos, consequentemente representando diversas funções dentro ou fora da célula. Nesta perspectiva, as proteínas CAP podem ser marcadores potenciais para o diagnóstico de estrogiloidíase no futuro.

Pode-se ressaltar a importância da análise de proteínas não categorizadas, uma vez que podem fornecer informações específicas da espécie. A busca por domínios neste grupo aponta para proteínas de grande importância parasitária, como *transferrin*, domínio CAP, inibidores do tipo *BTPI Knutiz*, astacinas, entre outras, que poderão futuramente ser analisadas. Recentemente, a importância dos inibidores do tipo *BTPI Knutiz* na infecção por *S. mansoni* foi descrita por Moraes *et al.*¹⁴⁷, como proteína chave na sobrevivência e manutenção do parasita em seus hospedeiros mamíferos. Esses inibidores estão entre as famílias de proteínas reguladas nas fêmeas parasitas de *S. ratti* e *S. stercoralis*^{77,93} e alta abundância em larvas filarioides de *S. venezuelensis*⁷⁹.

As proteínas do tipo Zeta14-3-3 foram presentes como componente menos abundantes do extrato proteico de L3. Esta proteína pode estar relacionada à proliferação, migração e alterações morfológicas durante o ciclo de vida do parasito¹⁴⁸. Em helmintos como *Schistosoma spp.* e *Echinococcus spp.*, a proteína Zeta14-3-3 foi caracterizada em diferentes estágios do desenvolvimento parasitário¹⁴⁸, e o seu papel na proliferação e sobrevivência dos parasitos apontaram

para promissores candidatos vacinais. No contexto do diagnóstico da estrogiloidíase, proteínas zeta 14-3-3 tem sido apontada como promissores marcadores, sendo reconhecida por soros de pacientes infectados com *S. stercoralis*⁷⁵. Recentemente, um recombinante 14-3-3 foi aplicado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana¹³⁴, apresentando bons resultados de sensibilidade e especificidade. E por fim, pode-se destacar a galectina, identificada como um componente menos abundante no extrato de L3. Isto pode ser devido ao fato de que algumas lectinas (principalmente do tipo C) de nematódeo tenham sido observadas na cutícula¹⁴⁹, e o presente estudo avaliou apenas o extrato proteico solúvel de L3. Vale ressaltar que algumas galectinas apresentam *SignalP*, enquanto que outras o domínio *HTMM*, ou seja, podem ser ou não secretadas. A função das galectinas nos nemátodos ainda não está bem compreendida, parece estar relacionada com a sobrevivência do parasita, desempenhando importante papel importante na relação parasita-hospedeiro, modulando negativamente a resposta imune¹⁵⁰. As galectinas foram identificadas em larvas infectantes de *S. stercoralis*^{74,75,76}, como produto de secreção/excreção dos estágios de FP e L3 de *S. ratti*⁷⁷. Porém, mais estudos podem auxiliar no entendimento das galectinas no gênero *Strongyloides*. No contexto do diagnóstico da estrogiloidíase o nosso grupo aponta a galectina como um alvo promissor, sendo reconhecida por amostras de soros de pacientes infectados com *S. stercoralis*^{122,98}.

Este estudo fornece uma visão geral das proteínas de larva filarióide de *S. venezuelensis* focada no diagnóstico de estrogiloidíase, e apontam para um catálogo de possíveis alvos para o diagnóstico da estrogiloidíase humana, incluindo galectinas, catepsinas, metaloproteinases e proteína Zeta 14-3-3 que podem ser melhor avaliadas no futuro. Acreditamos que o perfil proteico apresentado nesta análise possa ampliar nossa compreensão da constituição de proteínas dentro do

gênero *Strongyloides*, abrindo novas perspectivas para a pesquisa de biomarcadores.

5.3 Modelo experimental

A infecção experimental de ratos com *S. venezuelensis* tem sido utilizada para o estudo da estrongiloidíase, em diferentes abordagens. Com isso, *R. norvegicus* constitui um excelente modelo, principalmente por ser fácil manutenção em laboratório, além de eliminar um considerável número de ovos nas fezes quando infectados^{8,16,92}. Acrescenta-se que ratos Wistar são bem tolerantes a altas infecções com L3 de *S. venezuelensis*¹⁶.

Inicialmente para avaliação da infecção foi realizada a contagem de ovos de *S. venezuelensis* por grama de fezes, uma técnica bem recomendada literatura^{65,84,151}. Diversos estudos demonstram que o período pré-patente da infecção por *S. venezuelensis* em roedores (camundongos e ratos) varia entre o 5º e o 8º d.p.i., com o pico de eliminação de ovos nas fezes entre o 6º e o 18º d.p.i.^{83,84}. No presente estudo a eliminação de ovos iniciou-se no 5º d.p.i., e finalizou-se no 35º d.p.i. Em ratos, a eliminação do parasito geralmente ocorre no 24º a 42º d.p.i., no entanto, em alguns casos, pode ocorrer tardiamente entre 70 a 79 dias d.p.i.^{86,84,87}. Fatores relacionados ao hospedeiro como idade, sexo e base genética podem influenciar diretamente a carga parasitária⁹⁰, ou ainda à resistência e a suscetibilidade à infecção⁹¹.

Uma das principais vantagens na utilização do modelo experimental é a demarcação das fases da infecção. Neste contexto pode-se pontuar que a fase aguda ocorreu por volta do 8º d.p.i. e a fase de recuperação foi em torno 35º d.p.i. Resultados semelhantes foram demonstrados por Chiuso-Minicucci *et al.*¹⁵¹ avaliando a infecção experimental de ratos com *S. venezuelensis*.

Interessante observar o reconhecimento de diferentes bandas pelos soros dos animais infectados. Poucos estudos têm sido realizados no contexto da estrogiloidíase utilizando o *Western-blotting*^{59,56,152}, como ferramenta para o imunodiagnóstico. Considerando a estrogiloidíase experimental, dois estudos podem ser destacados, Silva *et al.*⁵⁹, avaliando a infecção com *S. ratti*, e Goulart de Carvalho *et al.*¹⁵² com *S. venezuelensis*. Nestes estudos diversas bandas foram consideradas imunodominantes, embora muitas sejam não específicas. No presente estudo as bandas de ~140kDa foram reconhecidas pelos soros de animais negativos e foram consideradas não específicas. Ocorreu o reconhecimento de bandas (~70-65kDa) na fase de recuperação. Por outro lado, bandas de menor peso molecular foram reconhecidas por amostras de soros de animais infectados, independente da fase de infecção. Goulart de Carvalho *et al.*¹⁵² demonstraram bandas imunorreativas de 17, 38 e 50kDa usando extratos alcalinos de larvas de *S. venezuelensis* na estrogiloidíase experimental.

Pode-se destacar que no presente estudo ocorreu o reconhecimento da banda de 30-40kDa nas fases aguda e de recuperação da infecção. Essa faixa de massa tem sido citada por vários autores^{75,122,155} como sendo de grande importância para o diagnóstico de estrogiloidíase humana. O nosso grupo¹²² identificou as proteínas presentes na faixa de 30-40kDa utilizando a proteômica, e dentre os constituintes proteicos tem-se destaque para as galectinas. Vale ressaltar a presença da galectina como um constituinte principal nas diferentes preparações antigênicas de L3 de *S. venezuelensis*.

Os recentes estudos têm demonstrado a possibilidade de utilização das galectinas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana e experimental¹¹⁸. A galectina foi destacada em estudos proteômicos como um alvo promissor para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*^{75,122}. Além disso, foi recentemente

demonstrada a expressão diferencial das galectinas nos produtos de secreção/excreção de diferentes estágios de *S. ratti*^{77,118}, especialmente na fêmea parasita.

Em se tratando de proteínas purificadas, poucas foram exploradas no contexto da estrogiloidíase, principalmente na infecção experimental. A fração de galectina até o momento não havia sido purificada em coluna de afinidade, e posterior avaliação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase experimental. Neste estudo empregou-se a coluna de α -lactose para a purificação da galectina a partir do extrato protéico solúvel de L3 *S. venezuelensis*. O eluato obtido representou a fração de galectina, como confirmado por *Western-blotting* utilizando anticorpo anti-galectina. Nesta abordagem, pode-se avaliar o reconhecimento da galectina ao longo da infecção experimental.

A busca por anticorpos específicos durante a infecção por *S. venezuelensis* tem sido foco de vários grupos de estudo^{151,153,154}. O extrato total de diferentes estágios evolutivos de *S. venezuelensis* tem sido avaliado, e o estágio de L3 tem sido o mais promissor no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana e experimental^{153,92}. O teste ELISA utilizando o extrato solúvel total de L3 foi capaz de detectar anticorpos IgG anti-*S. venezuelensis* na maioria das amostras de soro de animais ao longo da infecção experimental. Nosso grupo avaliando a infecção por *S. venezuelensis* demonstrou maior detecção de anticorpos IgG por ELISA até 28º d.p.i., utilizando o extrato alcalino de L3 como antígeno¹⁵⁴.

Analisando o conjunto de dados das amostras de soros dos animais infectados em relação aos não infectados, ao longo da infecção experimental, pode-se observar que ocorreu um aumento na produção de anticorpos IgG até o 21º d.p.i., seguido pela redução no 35º d.p.i. utilizando o extrato de L3, ou seja, uma menor positividade no início e no final da infecção.

No presente estudo, a variação individual no reconhecimento de frações antigênicas foi demonstrada pelas amostras de sangue sequenciais retiradas da veia caudal do mesmo animal em diferentes dias pós-infecção. Pode-se observar que o rato 1 apresentou comportamento diferenciado em relação aos demais, incluindo negatividade no extrato proteico não purificado (aos 7º d.p.i.). Isso reforça a importância da avaliação individualizada e seriada no diagnóstico sorológico da *estrongiloidíase*, fato ainda não demonstrado na literatura.

Considerando a fração purificada pode-se notar uma produção constante independente da fase da infecção. Embora esta fração seja reconhecida por 60% das amostras dos animais não apresentou variações na DO ao longo da cinética experimental, o que pode indicar a fração de galectina como uma promissora alternativa para o diagnóstico de *estrongiloidíase*, independente da fase da infecção. Nossos resultados são consistentes com achados anteriores¹¹⁸, que confirmam a importância das galectinas na interação parasito-hospedeiro.

Não se pode esquecer que as frações não ligadas também apresentam antígenos potenciais para o diagnóstico, uma vez que os anticorpos presentes nas amostras de soro da maioria dos animais reconheceram essa fração, especialmente após 21º d.p.i. Assim novos estudos, utilizando a purificação do extrato bruto em frações antigênicas específicas são recomendados.

Este estudo possibilitou avaliar a variação individual no reconhecimento de frações antigênicas ao longo da infecção experimental por *S. venezuelensis*, além de contribuir para a redução do número de animais utilizados. Neste contexto, nosso estudo segue o Princípio dos 3Rs (*Reduction, Replacement e Refinement*), no qual deve nortear a pesquisa científica com o uso consciente e humanitário de animais experimentais¹⁵⁶.

Adicionalmente podemos pontuar que a fração de galectina purificada obtida de *S. venezuelensis* L3 pode ser produzida em grandes quantidades, o que pode facilitar sua aplicação no futuro no diagnóstico de estrogiloidiase humana. Assim os presentes resultados confirmam a utilização de diferentes frações antigênicas no contexto do imunodiagnóstico da infecção experimental por *S. venezuelensis*. Além de destacar a possibilidade do emprego da fração de galectina como um alvo promissor para o imunodiagnóstico da estrogiloidose experimental.

6 CONCLUSÕES

- a) As proteínas diferencialmente expressas na L3, na sua maioria foram relacionadas com atividade enzimática, algumas estruturais, além da galectina. Por outro lado, na FP as proteínas diferencialmente expressas foram relacionadas com a síntese proteica, com o processo de reprodução, e com a homeostase celular;
- b) As galectinas, catepsinas, metaloproteinases e proteína Zeta 14-3-3 identificadas no extrato de L3 podem fazer parte de um repertório de possíveis alvos de proteínas a serem explorados no diagnóstico da estrogiloidiase humana;
- c) A fração de galectina purificada na coluna de α -lactose obtida do extrato proteico de L3 de *S. venezuelensis* pode ser aplicada no futuro no diagnóstico da estrogiloidiase humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olsen A, Van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, *et al.* Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103:967-72.
2. Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, *et al.* *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *Plos Negl Trop Dis.* 2013; 7:2288.
3. Puthiyakunnon S, Boddu S, Zhou X, Wang C, Li J, Chen X. Strongyloidiasis - an insight in to its global prevalence and management. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;83018.
4. Paula, FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitol.* 2011; 138:1331-40.
5. Paula FM, Castro E, Gonçalves- Pires MR, Marçal MG, 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 de São Paulo.* 2000; 42:51-5.
6. Concha R, Harrington W Jr, Rogers AI. Intestinal *Strongyloidiasis* recognition, management, and determinants of outcome. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39203-11.
7. Bollela, VR, Feliciano C, Teixeira AC, Junqueira AC, Rossi MA. Fulminant gastrointestinal hemorrhage dueto *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an AIDS patient. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46111-3.
8. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Atualização em diagnóstico imunológico e molecular de Estrongiloidíase humana. *Acta trop.* 2014; 135:33-43.
9. Sudré AP, Macedo HW, Peralta RH, Peralta JM. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev Patol Trop.* 2006; 35:173-84.
10. Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MR, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human *strongyloidiasis* by enzyme- linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:349-51.
11. Rigo CR, Lescano SZ, Marchi CR, Amato Neto V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41:648-53.
12. Costa- Cruz, JM *Strongyloides stercoralis*. In Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. 12^a ed., São Paulo: Atheneu. 2016;295-305.
13. Grove DI. Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol.* 1996; 38:251-309.
14. Campos DM e Ferreira MS. Estrongiloidíase. In. Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus fundamentos Gerais*. 2005; 2:293-303.

15. Huggins D. Estrongiloidíase grave: relato de um caso. Rev Soc Bras Med Trop. 1971; 5:159-71.
16. Viney M, Kikuchi T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. Parasitol. 2017; 144:285-94.
17. Jaleta TG, Zhou S, Bemm FM, Schär F, Khieu V, Muth S, *et al.* Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans- Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11:52.
18. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clin Infect Dis. 2001; 33:1040-7.
19. Azira NM, Abdel Rahman MZ, Zeehaida M. Review of patients with *Strongyloides stercoralis* infestation in a tertiary teaching hospital, Kelantan. Malays J Pathol. 2013; 35:71-6.
20. Braz AS, Andrade CA, Mota LM, Lima CM. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes. Rev Bras Reumatol. 2015; 55:368-80.
21. Toledo R, Munoz-Antoli C, Esteban JG. *Strongyloidiasis* with emphasis on human infections and their different clinical forms. Advan in Parasitol. 2005; 88:165-241.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites- Strongyloides. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2016. Citado 13 de Março de 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>.
23. Benincasa CC, Azevedo FO, Canabarro MS, Valentim HM, Silva VD, Superti SV, *et al.* Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*: Relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 19:413-415.
24. Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on Strongyloidiasis in the immune compromised host. Curr Infect Dis Rep. 2011; 13:35-46.
25. Abraham D, Hess JA, Mejia R, Nolan TJ, Lok JB, Lustigman S, *et al.* Immunization with the recombinant Ss-IR antigen induces protective immunity to *Strongyloides stercoralis* infection in mice. J Vaccine. 2011; 29:8134-40.
26. Bonne-Année S, Hess JA, Abraham D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. Immunol Res. 2011;51(2-3):205-24.
27. Mota-Ferreira DM, Gonçalves-Pires MR, Júnior AF, Soplete MC, Abdallah VO, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human *strongyloidiasis*. Acta Trop. 2009; 109:103-7.
28. Genta RM, Frei DF, Linke MJ. Demonstration and partial characterization of parasite specific immunoglobulin A responses in human *strongyloidiasis*. J Clin Microbiol. 1987; 25:1505-10.

29. World Gastroenterology Organization. Citado 25 de Abril de 2019. Disponível em: [http://www. Worldgastroenterology.org/Strongyloidiasis](http://www.Worldgastroenterology.org/Strongyloidiasis).
30. Romero- Cabello R, Gómez JV, González MH, Feregrino RR. Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. BMJ Case Rep. 2012.
31. Santana AT, Loureiro M. Síndrome de hiperinfecção e/ou disseminação por *Strongyloides stercoralis* em pacientes imunodeprimidos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal- RN, Brasil. Rev Bras Anal Clin. 2017; 49:351.
32. Greaves D, Coggle S, Pollard C, Haliyu S, Moore E. *Strongyloides stercoralis* infection. 2013;347:46.
33. Marcos LA, Terashim A, Dupont HL, Gotuzzo E. Strongyloides hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102:314-8.
34. Neva FA. Biology and immunology of human *strongyloidiasis*. J Infect Dis. 1986; 153:397-406.
35. Geri G, Rabbat A, Mayaux J, Zafrani L, Chalumeau-Lemoine L, Guidet B, *et al.* *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a case series and a review of the literature. Infection. 2015; 43:691-8.
36. De Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes DM, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:119-21.
37. Silva ML, El, Souza AB, Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, *et al.* Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. Acta Trop. 2016; 154:133.
38. Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Enteric parasites and AIDS. São Paulo Med J. 1999; 117:266-73.
39. Cysique LA, Maruff P, Brew BJ. Prevalence and pattern of neuropsychological impairment in human immunodeficiency virus- infected/ acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) patients across pre- and post-highly active antiretroviral therapy eras: a combined study of two cohorts. J Neurovirol. 2004; 10:350-7.
40. Ubonvan J, Duangdao W, Saowaluk S, Darawan W, Yupin S. Prevalence and risk factors of acquiring *Strongyloides stercoralis* infection among patients attending a tertiary hospital in Thailand. Pathog Glob Health. 2014; 108:137-140.
41. Lam CS, Tong MK, Chan KM e Siu, YP. Estrongiloidíase disseminada: um estudo retrospectivo do curso clínico e dos resultados. Euro J. Clin Micro Infect Dis. 2006:14-8.
42. Lim A, Katz K, Krajden S, Fuksa M, Keytone JS, Kain KC. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and Management. CMAJ. 2004; 17:479-84.

43. Lau Chong C, Samalvides Cuba F, Terashimalwashita A. Evaluación de técnicas parasitológicas en el diagnóstico de estrongiloidiasis por *Strongyloides stercoralis*. Rev Med Hered. 2005; 16:11-8.
44. Bounfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clin Microbiol Infect. 2015;542-52.
45. Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ancylostomon (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel Mit h. Geneesk. Lab Weltevreden Feestbundel. 1917:41-7.
46. Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. Rev Serv Saúde Pública. 1948:507-624.
47. Rugai E Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes: modificações do método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954; 14:5-8.
48. Arakaki T, Hasegawa H, A Sato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, et al. New method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. Japan J Trop Med Hyg. 1988; 16:11-7.
49. Harada U, Mori OA. A new method for culturing hookworm. Yonago Acta Med. 1955; 1:177-9.
50. Kozubsky L, Archelli S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. Acta bioq clín lati -amer. 2004; 38:333-38.
51. Inês E de J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, et al. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. Acta Trop. 2011; 120:206-10.
52. Khieu V, Schar F, Forrer A, Hatterdorf J, Marti H, Socheat D, et al. High prevalence and spatial distribution of *Strongyloides stercoralis* in rural Cambodia. Plos Negl Trop Dis. 2014; 8:2852.
53. Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffe I, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 Recombinant Antigen Based Assays for Immunodiagnosis of *Strongyloidiasis*. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9:3694.
54. Krolewiecki AJ, Ramanathan R, FIN V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, et al. Improved Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using Recombinant Antigen- Based Serologies in a Community-Wide Study in Northern Argentina. CVI. 2010; 17:1624-30.
55. Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, et al. Accuracy of Five Serologic Tests for the Follow up of *Strongyloides stercoralis* Infection. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9:491.
56. Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MR, Gonçalves AL, Rodrigues RM, Ueta MT, et al. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. Diag Microbiol Infect Dis. 2010; 67:153-161.

57. Gonzaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT *et al.* IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunol Lett.* 2011; 139:87-92.
58. Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DM L, Chieffl PP, Gryscek RC. Brief communication membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human *strongyloidiasis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2015; 57:77-80.
59. Silva LP, Barcelos IS, 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; 98:687-91.
60. Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco Source AE. Serum IgG Reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa Larval Proteins of *Strongyloides stercoralis* in Individuals with Strongyloidiasis. *J Infect Dis.* 1993; 168:784-7.
61. El-Badry AA. ELISA-based coproantigen in human *strongyloidiasis*: a diagnostic method correlating with worm burden. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009; 39:757-68.
62. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, CiminoRo, Krolewiecki AJ, *et al.* acurácia diagnóstica de cinco testes sorológicos para infecção de *Strongyloides stercoralis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014: 264010.
63. Formenti F, Buonfrate D, Prandi R, Marquez M, Caicedo C, Rizzi E, *et al.* Comparison of *S. stercoralis* Serology Performed on Dried Blood Spots and on Conventional Serum Samples. *Front Microbiol.* 2016; 7:1778.
64. Repetto SA, Ruybal P, Solana ME, Lopez C, Berini, Alba Soto CD, *et al.* Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Trop.* 2016; 157:169-77.
65. Marra NM, Chiuso- Minicucci F, Machado GC, Zorzella Pezavento SF, França G, Ishikawa LL, *et al.* Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. *Mém inst Oswaldo Cruz.* 2010; 150:57-61.
66. Van der Ree AM, Mutapi F. The helminth parasite proteome at the host-parasite interface e Informing diagnosis and control. *Exp Parasitol.* 2015; 157:48-58.
67. Hein MY, Chapter-Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: Walhout AJ, Vidal, M. *Hand book of Systems Biology.* San Diego: Acad Press. 2013;3-25.
68. López JL. Two- dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chrom B, Analytical Tools for Proteomics.* 2007; 849:1-2.
69. Harve M Jordan TW. Flamme AC. Differential liver protein expression during schistosomiasis. *Infect Immun.* 2007; 75:736-44.

70. Manivannan B, Rawson P, Jordan TW, Karanja DM, Mwinzi PN, Secor WE, *et al.* Identification of cytokeratin 18 as a biomarker of mouse and human hepatosplenic schistosomiasis. *Infect Immun.* 2011; 79:2051-8.
71. Gilmore JM, Washburn MP. Advances in *Shotgun Proteomics* and the Analysis of Membrane Proteomes. *J Prot.* 2010; 73:2078-2091.
72. Barrett J, Jefferies JR, Brophy PM. Parasite proteomics. *Parasitol Today.* 2000; 16:400-403.
73. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol.* 2000; 192:280-8.
74. Marcilla A, Sotillo J, Pérez-García A, Igual-Adell R, Valero ML, Sánchez-Pino MM, *et al.* Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology.* 2010; 137:1577-83.
75. Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, *et al.* *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol Research.* 2016; 115:4007-12.
76. Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, *et al.* Identification of antigenic proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. *Parasitol Research.* 2017; 116:1687-93.
77. Soblik H, Younis AE, Mitreva M, Renard BY, Kirchner M, Geisinger F, *et al.* Life cycle stage- resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti* - Identification, of stage- specific proteases. *Mol Cell Prote.* 2011; 10:1-16.
78. Tsuji N, Kawazu S, Nakamura Y, Fujisaki K. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Vet Med Sci.* 1993; 55:881-3.
79. Maeda Y, Palomares Rius JE, Hino A, Afrin T, Mondal SI, Nakatake A, *et al.* Secretome analysis of *Strongyloides venezuelensis* parasitic stages reveals that soluble and insoluble proteins are involved in its parasitism. *Parasit Vectors.* 2019; 12:21.
80. Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of both innate immunity and acquired immunity for rapid expulsion of *S. venezuelensis*. *Front Immunol.* 2014; 5:118.
81. Araújo P. Distribuição de helmintos no intestino delgado de *Rattus norvegicus* naturalmente infestados. II. *Strongyloides ratti*, Sandground, 1925 e *S. venezuelensis*, Brumpt, 1934. *Ver Fac Farm Bioq Univ São Paulo.* 1967; 1:179-190.
82. Hasegawa H, Orido Y, Sato Y, Otsuru M. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. *Jpn J Parasitol.* 1988; 37:429-34.

83. Taira N, Nakamura Y, Almeida MA, Saeki H. Massive experimental infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats and absence of sudden death. J Vet Med Sci. 1995; 57:855-8.
84. Nakai ES, Amarante AF. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. Rev Bras Parasitol Vet. 2001; 10:1-6.
85. Amarante AF, Oliveira-Sequeira TC. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven in bred strains of mice. Arq Bras Med Vet Zootec. 2002; 54:273-78.
86. Tamura N. Studies on availability of *Strongyloides venezuelensis* for experimental model of strongyloidosis. Bull NipVet Anim Sci University. 1993;94-6.
87. Baek BK, Islam MK, Kim BS, Lim CW, Hur J, Oluoch AO, *et al.* Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. Vet Parasitol. 2003; 113:217-27.
88. Harkness JE. Roedores. Biologia e clínica de coelhos e roedores. São Paulo: Roca; 1993;238.
89. Andersen ML. Experimentação animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP. 2004.
90. Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. J Vet Med Sci. 2002; 64:457-61.
91. Behnke JM, Lowe A, Menge D, Iraqi F, Wakelin D. Mapping the genes for resistance to gastrointestinal nematodes. Acta Parasitol. 2000; 45:1-13.
92. Gonçalves AL, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immune diagnosis of human *strongyloidiasis*. Diag Microbiol Infect Dis. 2012; 72:79-84.
93. Hunt V, Tsai I, Selkirk M, Viney M. The genome from *Strongyloides* spp. provides insights into families of proteins with a putative role in nematode parasitism. Parasitology. 2017;144:343-358.
94. Neves DP, Melo AL, Genaro, Linardi PM. Diagnóstico parasitológico. In: Parasitologia Humana. 11ª. ed. São Paulo: Atheneu. 2005; p. 494.
95. Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folinphenol reagent. J Biol Chem. 1951; 93:265-75.
96. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-5.

97. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J Coun Scient Ind Re. 1939; 12:50-2.
98. Corral MA, Paula FM, Meisel DM, Abdala E, Costa FS, Pierrotti LC. IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients. Acta Trop. 2019;190: 357-60.
99. Mineo JR, Silva DA Sopolete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia LE, *et al.* Medidas de Biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU. 2005.
100. Hunt VL, Tsai IJ, Coghlan A, Reid AJ, Holroyd N, Foth BJ, *et al.* The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. Nat Genet. 2016; 48:299-307.
101. Lok JB. *Strongyloides stercoralis* and relatives: recent advances in general and molecular biology. Curr Trop Med Rep. 2014; 1:194-206.
102. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat Rev Immun. 2003; 3:733-44.
103. Cuesta-Astroz Y, Oliveira FS, Oliveira G. Helminth secretomes reflect different life styles and parasitized hosts. Inter J for Parasitol. 2017; 47:529-44.
104. Fetterer RH, Rhoads ML. Biochemistry of nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. Vet Parasitol. 1993;46(1-4):103-111.
105. Visa N, Percipalle P. Nuclear functions of actin. Cold Spri Harb Pers Biol. 2010:620.
106. Rottner K, Stradal TE. Actin dynamics and turn over in cell motility. Current Opin in Cell Biol.2011; 23:569-78.
107. Sleumer MC, Wei G, Wang Y, Chang H, Xu T, Chen R, Zhang MQ. Regulatory elements of *Caenorhabditis elegans* ribosomal protein genes. BMC Genomics. 2012;28:433.
108. McClung JK, Jupe ER, Liu XT, Dell'Orco RT. Prohibitin potential role in senescence, development, and tumor suppression. Exp Gerontol.1995;30:99-124.
109. AL Theiss, SV Sitaraman. O papel e o potencial terapêutico da proibitina na doença Biochim. Biophys. Acta. 2011; 1813:1137-43.
110. Sapio MR, Hilliard MA, Cermola M, Favre R, Bazzicalupo P. The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol. 2005; 282:231-45.
111. Mello LV, O'Meara H, Rigden DJ, Paterson S. Identificação de novas proteases aspárticas de *Strongyloides ratti* e caracterização de suas relações evolutivas, expressão específica de estágio e estrutura molecular. BMC Genomics. 2009;10: 611-26.

112. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 1993; 72:1.
113. Wandinger SK, Richter K, J Buchner. A maquinaria de acompanhante Hsp90 J. *Biol Chem.* 2008; 283:18473-7.
114. Yoshida A, Nagayasu E, Nishimaki A, Sawaguchi A, Yanagawa S. Maruyama H. Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Int.* 2011; 60:75-83.
115. Abuelhassan EY, Frank G, Ajonina-Ekoti I, Soblik H, Mitreva HS, Makedonka, *et al.* W. Stage-specific excretory-secretory small *heatshock* proteins from the parasitic nematode *Strongyloides ratti*– putative links to host's intestinal mucosal defense system. *FEBS J.* 2011; 3319-36.
116. Wang T, Ma G, Ang CS, Korhonen PK, Koehler AV, Young ND, *et al.* High-performance LC-MS / MS-based proteomic analysis of short-term in vitro culture excretory- secretory products of *Haemonchus contortus*. *J Proteomics.* 2019;204: 103375.
117. Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. 2006; 53:33–64.
118. Ditgen D, Anandarajah EM, Reinhardt A, Younis AE, Witt S, Hansmann J, *et al.* Comparative characterization of two galectins excreted-secreted from intestine-dwelling parasitic and free-living females of the soli-transmitted nematode *Strongyloides*. *Mol Biochem Parasitol.* 2018; 225:73-83.
119. Young AR, Meeusen EN. Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glyc J.* 2002; 19:601-6.
120. Hewitson JP, Harcus YM, Curwen RS, Dowle AA, Atmadja AK, Ashton PD, *et al.* The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: Proteomic profile of adult excretory–secretory products. *Mol Bioc Parasitol.* 2008; 60:8–21.
121. Mulvenna J, Hamilton B, Nagaraj SH, Smyth D, Loukas Um, Gorman JJ. Proteomics Analysis of the Excretory/Secretory Component of the Blood-feeding Stage of the Hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Prot cel mol.* 2009; 8:109-21.
122. Corral MA, Paula FM, Meisel DM, Castilho VL, Goncalves EM, Levy D, *et al.* Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology.* 2017; 144:124-130.
123. Swierczewski BE, Davies SJ. A Schistosome cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Essential for Parasite Viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3:505.
124. Wang Y, Bai X, Zhu H, Wang X, Shi H, Tang B, *et al.* Immunoproteomic analysis of the excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* adult worms and newborn larvae. *Vet parasitic.* 2017; 10:579.

125. Lorenzatto KR1, Monteiro KM, Paredes R, Paludo GP, da Fonsêca MM, Galanti N, *et al.* Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene*. 2012;10;506:76-84.
126. McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam AA, Staunton C, Neva FA. *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates skin penetration by infective larvae. *Exp Parasitol*. 1990; 70:134-43.
127. Gallego SG, Loukas A, Slade RW, Neva FA, Varatharajalu R, Nutman TB, *et al.* Identification of an astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitol Internat*. 2005;54:123-133.
128. Rebello KM, Barros JS, Mota EM, Carvalho PC, Perales J, Lenzi HL, *et al.* Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis*, a human parasitic nematode. *J Proteomics*. 2011;74:1545-59.
129. Varatharajalu R, Parandaman V, Ndao M, Andersen JF, Neva FA. *Strongyloides stercoralis* strongylastacin excretory-secretory protein specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. *Microbiol Immunol*. 2011; 55:115-22.
130. Ford L, Zhang J, Liu J, Hashmi S, Fuhrman JA, Oksov Y, *et al.* Functional Analysis of the Cathepsin- Like Cysteine Protease Genes in Adult *Brugia malayi* Using RNA Interference. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3:377.
131. Hashmi S, Britton C, Liu J, Guiliano DB, Oksov Y, Lustigman S. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2002; 277:3477-86.
132. Yang Z, Li W, Yang Z, Pan A, Liao W, Zhou X. A novel antigenic cathepsin B protease induces protective immunity in *Trichinella*-infected mice. *J vaccine*. 2018; 36:248-55.
133. McDermott L, Cooper A, Kennedy MW. Novel classes of fatty acid and retinol binding protein from nematodes. *Mol Cell Biochem*. 1999;192:69-75.
134. Massari ME & Murre C. Helix-loop helix proteins: transcription regulators in eukaryotic organisms. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:429-40.
135. Son J, Kim S, Kim SE, Lee H, Lee MR & Hwang KY. Structural Analysis of an Epitope Candidate of Triosephosphate Isomerase in *Opisthorchis viverrini*. *Scien Repor*. 2018; 8:150-75.
136. Ortona E, Vaccari S, Margutti P, Delunardo F, Rigano R, Profumo E, *et al.* Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:124-30.
137. Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina WE, Rodriguez-Caabeiro F. Stress Response to Cold in *Trichinella* Species. *Cryobiology*. 2001;293-302.

138. Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heatshock protein 83 for these ro diagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37:1591-3.
139. Levenhagen, MA, de Almeida Araújo Santos, F., Fujimura, PT, Carneiro, AP, Costa-Cruz, JM, Goulart, LR. Caracterização estrutural e funcional de um novo scFv anti-HSP60 de *Strongyloides* sp. *Relatórios científicos.* 2015;5:10447.
140. Burdukiewicz M, Sobczyk P, Chilimoniuk J, Gagat P, Mackiewicz P. Prediction of Peptides Signal in Proteins from Malari Parasites. *Int J Mol Sci.* 2018; 19:3709.
141. Ying X, Chen X, Wang Y, Fang W, Luo D. Protein signal sequence analysis of nematode filarial parasite *Brugia malayi* and evolution of secreted proteins in parasites. *Parasitol Res.* 2009; 104:1321-6.
142. Marcus YM, Parkinson J, Fernánde C, Daub J, Selkirk ME, Blaxter ML, *et al.* Análise da sequência de sinais de marcadores de seqüência expressa do nematoide *Nippostrongylus brasiliensis* e evolução de proteínas secretadas em parasitas. *Biol gen.* 2004; 5:39.
143. Sotillo J, Sanchez-Flores A, Cantacessi C, Marcus Y, Pickering D, Bouchery T, *et al.* Secreted Proteomes of Different Developmental Stages of the Gastrointestinal Nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13:2736-51.
144. Cantacessi C, Campbell BE, Visse, A, Geldhof P, Nolan MJ, Nisbet AJ, *et al.* A portrait of the “SCP/TAPS” proteins of eukaryotes - Developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes. *Biotechnol.* 2009;27:376-88.
145. Hawdon JM, Narasimhan S, Hotez PJ. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 99:149–65.
146. Murray J, Gregory WF, Gomez-Escobar N, Atmadja AK, Maizels RM. Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespidvenomallergens and *Ancylostoma* secreted proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 118:89-96.
147. Morais SB, Figueiredo BC, Assis NRG, Alvarenga DM, de Magalhães MTQ, Ferreira RS, *et al.* *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. *PLoS Pathog.* 2018; 4:1006870.
148. Siles-Lucas MM, Gottstein B. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol.* 2003;19: 575–81.
149. Heizer E, Zarlenga DS, Rosa B, Ga, X, Gasser RB, De Graef J, *et al.* Transcriptome analyses reveal protein and domain families that delineate stage-related development in the economically important parasitic nematodes, *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. *BMC Genomics.* 2013; 14:118.

150. Young AR, Meeusen EN. Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J*. 2004; 19:601-6.
151. Chiuso-Minicucci NM, Marra SF, Zornella-Pezavento TG, França L, Ishikawa MR, Amarante AF, *et al*. Recovery from *Strongyloides venezuelensis* infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response, *Parasite Immunol*. 2010; 32:74-8.
152. Goulart de Carvalho EF, Sousa JE, Gonçalves AL, Cunha-Junior JP, Costa-Cruz JM. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, partenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. *Exp. Parasitol*. 2015; 157:117-23.
153. Gonçalves AL, Silva CV, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Exp Parasitol*. 2012;130:205-8.
154. Marques PD, Malta FM, Meisel DM, Corral MA, Pinho JR, Costa-Cruz JM, *et al*. *J Helminthol*. 2016; 90:422-7.
155. Sudré AP, Siqueira RC, Barreto MG, Peralta RH, 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; 101:1117-1123.
156. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA). Acesso em: 03 fev. 2019. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_30_de_02022016.html.