

William Henry Roldán Gonzáles

Caracterização do excretoma/secretoma de *Strongyloides venezuelensis* e
sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

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

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo César
Borges Gryscek
Coorientadora: Dra. Fabiana Martins de
Paula

São Paulo

2022

William Henry Roldán Gonzáles

Caracterização do excretoma/secretoma de *Strongyloides venezuelensis* e sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo César Borges Gryscek
Coorientadora: Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Roldán Gonzáles, William Henry
Caracterização do excretoma/secretoma de
Strongyloides venezuelensis e sua aplicação no
imunodiagnóstico da estrogiloidiase humana / William
Henry Roldán Gonzáles. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Ronaldo César Borges Gryscek.
Coorientador: Fabiana Martins de Paula.

Descritores: 1.Estrongiloidiase 2.Proteômica
3.Espectrometria de massas 4.Antigenos 5.Anticorpos
6.Testes sorológicos

USP/FM/DBD-250/22

Responsável: Erivalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: William Henry Roldán Gonzáles

Título: *Caracterização do excretoma/secretoma de Strongyloides venezuelensis e sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências; Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Aprovado em 25 de outubro de 2022

Banca Avaliadora:

Prof(a). Dr(a). Beatriz Simonsen Stolf Carboni

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Prof. Dr. William de Castro Borges

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Prof(a). Dr(a). Kelly Aparecida Kanunfre

Instituição: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - IMTSP

DEDICATORIA

*Dedicado aos meus pais, Enrique Roldán
Ríos e María Gonzáles Rojas, que sempre
me apoiaram no caminho da educação e
da ciência.*

*Dedico esta tese também a Juliana
Oliveira Santos, minha amada
companheira neste maravilhoso país
chamado Brasil.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado em mais uma jornada. Agradeço também pela saúde, força e determinação para continuar o dia a dia desta vida, e por me permitir realizar tantos sonhos, errar, aprender e crescer.

Aos meus pais, Enrique e María, pelo exemplo de dedicação e superação. Sinto-me orgulhoso de ser seu filho. Obrigado por me apoiarem em tudo nesta vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Ronaldo César Borges Gryscek e Prof^a. Dra. Fabiana Martins de Paula pela oportunidade, competência e confiança. Obrigado por acreditar em mim e em minhas capacidades para desenvolver o projeto de pesquisa, nestes maravilhosos quatro anos de convivência com vocês no Laboratório de Investigação Médica 06 (LIM06).

Ao Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta e ao Dr. Guilherme Rabelo Coelho do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, pela sua amizade, pela força e pelo suporte constante com as análises de espectrometria de massas. Obrigado por acreditar em mim e no meu projeto de pesquisa.

Às colegas e amigas do Laboratório de Investigação Médica 06 (LIM06), especialmente a Dirce Mary Correia Lima Meisel, Ana Maria Gonçalves da Silva, Susana Angélica Zevallos Lescano, Maria Cristina Conceição Melo, Michele Soares Gomes Gouvêa, Bruna Barroso Gomes e Natália Marques pela sua amizade, pelo companheirismo, pelo suporte, pela força e pela torcida durante o convívio no laboratório. Da mesma forma gostaria de agradecer a os alunos de iniciação científica, Natália Abdo e Rodrigo Espíndola, pelas alegrias e risadas que vocês trouxeram ao laboratório nestes últimos meses de convívio. Muito obrigado.

Ao pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em especial a Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro, Maria Carmen Arroyo Sanchez, Mahyumi Fujimori e Mussya Cisotto Rocha, pela ajuda e suporte constante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo com uma bolsa de doutorado (Processo N° 142056/2018-9).

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram, em forma direta ou indireta, para a realização da minha tese, o meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

*Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta.*

Carl Sagan

RESUMO

Roldán Gonzáles WH. *Caracterização do excretoma/secretoma de Strongyloides venezuelensis e sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

O presente estudo caracterizou, mediante análise imunoproteômica, os produtos de excreção/secreção (E/S) de larvas infectantes (iL3) de *S. venezuelensis* que foram mantidas a 37°C por 24 horas em meio RPMI 1640 (E/S-RPMI) ou em tampão fosfato salino, pH 7,2 (E/S-PBS) e avaliar sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana. Os resultados mostraram que os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS possuem 20 e 21 bandas proteicas, com pesos moleculares entre 10 a 348 kDa, e presença de serinoproteases e metaloproteases. O *Western-blotting* demonstrou que ambos os tipos de produtos de E/S possuem ao menos 16 bandas antigênicas que foram reconhecidas pelo soro de pacientes com estrogiloidíase, das quais apenas uma banda de 36 kDa possui 93% de sensibilidade, 100% de especificidade e sem ocorrência de reatividade cruzada. A espectrometria de massas identificou um total de 71 e 62 proteínas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, respectivamente, das quais apenas 14 proteínas antigênicas foram compartilhadas entre ambos os tipos de produtos de E/S. A análise bioinformática sugere que mais de 50% das proteínas identificadas nos produtos de E/S são secretadas ao meio extracelular dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e menos de 20% são realmente secretadas pela via clássica. Entre as diferentes proteínas identificadas no presente estudo, pode se ressaltar a presença de uma arginina quinase não glicosilada de 37 kDa, presente em ambos os tipos de produtos de E/S, que coincide com a banda de 36 kDa anteriormente mencionada. Existe uma proteína de domínio CAP que possui 50% de identidade com a proteína recombinante NIE de *S. stercoralis*, tem o potencial para capturar ácidos graxos e leucotrienos, e possui a sequência “KGD” com capacidade para se unir especificamente à integrina das plaquetas, inibindo assim a agregação plaquetária. Por outro lado, existe uma enolase de 47 kDa identificada em ambos os produtos de E/S que coincide com uma banda antigênica de 47 kDa reconhecida por mais do 96% dos pacientes com estrogiloidíase. Esta enolase possui o potencial para se unir ao plasminogênio, podendo ser utilizada ativamente pela iL3 de *S.*

venezuelensis durante sua migração pelos tecidos do hospedeiro. Destaca-se a também a presença de duas proteínas 14-3-3 identificadas em ambos os tipos de produtos de E/S e com um alto grau de similaridade com seus homólogos presentes no ser humano e no camundongo. A análise bioinformática mostrou que as duas proteínas 14-3-3 são potencialmente antigênicas e são secretadas dentro de vesículas extracelulares. A análise estrutural mostrou que as duas proteínas 14-3-3 possuem a capacidade de união a diferentes proteínas fosforiladas, relacionadas com a ativação de linfócitos T e B, sugerindo um possível papel fundamental na modulação da inflamação e da resposta imune do hospedeiro. Todos estes resultados mostram que *S. venezuelensis* possui um interessante conjunto de proteínas com potencial antigênico que podem ser explorados como possíveis novos marcadores para o sorodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Descritores: Estrogiloidíase; Proteômica; Espectrometria de massas; Antígenos; Anticorpos; Testes sorológicos.

ABSTRACT

Roldán González WH. *Characterization of Strongyloides venezuelensis excretome/secretome and its application in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

The present study characterized, through immunoproteomic analysis, the excretory/secretory (E/S) products of infective larvae (iL3) of *S. venezuelensis* obtained by incubating at 37°C for 24 hours in RPMI 1640 medium (E/S-RPMI) or in saline phosphate, pH 7.2 (E/S-PBS) and to evaluate its application in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. The results showed that the E/S-RPMI and E/S-PBS products have 20 and 21 protein bands, respectively, with molecular weights between 10 and 348 kDa, with presence of serine proteases and metalloproteases. *Western-blotting* demonstrated that both types of E/S products have at least 16 antigenic bands that were recognized by the sera of patients with strongyloidiasis, of which only a 36 kDa band has 93% sensitivity, 100% specificity, and no cross-reactivity. Mass spectrometry identified a total of 71 and 62 proteins in the E/S-RPMI and E/S-PBS products, respectively, of which only 14 antigenic proteins were shared between both types of E-S products. Bioinformatic analysis suggests that more than 50% of the proteins identified in the E/S products are secreted to the extracellular medium within extracellular vesicles or exosomes and less than 20% are actually secreted by the classical pathway. Among the different proteins identified in the present study, the presence of a non-glycosylated arginine kinase of 37 kDa, present in both types of E/S products, which coincides with the previously mentioned 36 kDa band, can be highlighted. There is a CAP domain protein that has 50% identity with the recombinant protein NIE of *S. stercoralis*, has the potential to capture fatty acids and leukotrienes, and has the sequence “KGD” with the ability to bind to platelet integrin, inhibiting platelet aggregation. On the other hand, a 47 kDa enolase was identified in both E-S products and coincides with a 47 kDa antigenic band recognized by more than 96% of patients with strongyloidiasis. This enolase has the potential to bind to plasminogen and can be actively used by *S. venezuelensis* iL3 during its migration through host tissues. It was

also identified the presence of two 14-3-3 proteins identified in both types of E/S products and with a high degree of similarity with their homologs present in humans and mice. Bioinformatic analysis showed that these two 14-3-3 proteins are potentially antigenic and are secreted into extracellular vesicles. Furthermore, these two 14-3-3 proteins have the ability to bind phosphorylated proteins related to the activation of T and B lymphocytes, suggesting a possible fundamental role in modulating the host inflammation and immune response. All these results show that *S. venezuelensis* has an interesting set of proteins with antigenic potential that can be explored as possible new markers for the serodiagnosis of human strongyloidiasis.

Descriptors: Strongyloidiasis; Proteomics; Mass spectrometry, Antigens; Antibodies; Serologic tests.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Prevalência mundial estimada da estrogiloidíase no ano 2017, descrito por Buonfrate et al. (2020). 2
- Figura 2.** Representação esquemática do ciclo biológico de *S. stercoralis*. 3
- Figura 3.** Eletroforese em gel poliacrilamida 12% e coloração com nitrato de prata dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis* (10 µg) obtidos após manutenção *in vitro* a 37°C por 48 horas, em meio de cultura RPMI 1640 (2) ou em tampão fosfato salino (3). Como controle, observa-se o padrão de PM à esquerda (1). 25
- Figura 4.** Atividade protease dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* obtidos após manutenção *in vitro* a 37°C por 48 horas em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2)(C) e em presença de inibidor de cisteinoproteases (IAA), serinoproteases (PMSF), e metaloproteases (EDTA) à concentração final de 0.01M. Adicionalmente, os produtos de E/S também foram incubados com uma mistura dos inibidores mencionados (MIX), mostrando ainda a presença de uma banda com atividade protease. 27
- Figura 5.** Reatividade dos soros de pacientes com estrogiloidíase, com outras helmintíases e indivíduos saudáveis contra os produtos E/S-RPMI (esquerda) e E/S-PBS (direita) testados pelo teste de ELISA para anticorpos IgG. Ambos gráficos mostram o valor *cut-off* para os produtos E/S-RPMI (0,35) e para os produtos E/S-PBS (0,30). 28
- Figura 6.** Bandas antigênicas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS detectadas por anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda) e soro controle negativo (direita) mediante a técnica de *Western-blotting*. 31
- Figura 7.** Reatividade dos anticorpos IgG contra os produtos E/S-RPMI mediante o teste de *Western-blotting* num painel representativo de soros de pacientes com estrogiloidíase (+), indivíduos saudáveis (-) e pacientes com outras helmintíases: ascaridíase (A), trichuriase (B), enterobíase (C); ancilostomíase (D), himenolepíase (E), neurocisticercose (F), difilobotríase (G), esquistossomose (H) e fasciolose (I). 32
- Figura 8.** Eletroforese bidimensional dos produtos de E/S de larvas de *S. venezuelensis* mantidas em meio RPMI-1640 (A) e em tampão fosfato salino (B) corados com nitrato de prata. Como controle, o marcador de PM é mostrado à esquerda de cada gel. 35
- Figura 9.** Reatividade de anticorpos IgG do soro controle positivo (*pool* de soros de pacientes com estrogiloidíase) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI), separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 41 *spots* antigênicos, marcados em cor vermelha (imagem inferior). 36
- Figura 10.** Reatividade de anticorpos IgG do soro controle positivo (*pool* de soros de pacientes com estrogiloidíase) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em tampão fosfato salino (E/S-PBS), separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 31 *spots* antigênicos (imagem inferior). Os *spots* descritos em cor verde correspondem a novos *spots*. 37
- Figura 11.** Reatividade de anticorpos IgG do soro controle negativo (*pool* de soros de indivíduos saudáveis) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-

- 1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 13 *spots* antigênicos (imagem inferior). Os *spots* descritos em cor verde correspondem a novos *spots*. 38
- Figura 12.** Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com nematódeos contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 9 *spots* antigênicos (imagem inferior). 39
- Figura 13.** Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com cestóides contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 6 *spots* antigênicos (imagem inferior). 40
- Figura 14.** Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com trematódeos contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 9 *spots* antigênicos (imagem inferior). 41
- Figura 15.** Gráfico de dispersão (ponto isoelétrico = x; peso molecular em kDa = y) das proteínas identificadas nas três frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI (direita) e sua similaridade com os resultados obtidos no WB bidimensional para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda). 45
- Figura 16.** Gráfico de dispersão (ponto isoelétrico = x e peso molecular em kDa = y) das proteínas identificadas nas três frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI (direita) e sua similaridade com os resultados obtidos no WB bidimensional para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda). 52
- Figura 17.** Alinhamento múltiplo das três sequências de arginina quinase identificadas em ambos os tipos de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. Os aminoácidos altamente conservados são mostrados em azul escuro e os medianamente conservados, em azul claro. Os domínios N-terminal e C-terminal fosfagênio quinase foram sublinhados em verde e vermelho, respectivamente. 56
- Figura 18.** Reconstrução filogenética das argininas quinase identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* (ressaltadas em vermelho e azul), e a sua similaridade com seus homólogos presentes nas outras espécies do gênero *Strongyloides*. O fenograma também inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA). 57
- Figura 19.** Reconstrução filogenética das argininas quinase de 37 kDa (letras vermelhas), 40,5 kDa e 45,3 kDa identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e a sua similaridade com seus homólogos presentes em outros nematódeos parasitos. O fenograma também inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA). 58
- Figura 20.** Localização das regiões potencialmente antigênicas específicas (cor vermelha) da arginina quinase de 37 kDa identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, e sua comparação com seus homólogos presentes em *S. stercoralis* e em outras espécies de nematódeos parasitos mediante um alinhamento múltiplo, mostrando também as regiões

- altamente conservadas (azul escuro) e medianamente conservadas (azul claro). O código Uniprot de cada proteína é descrita na Figura 17. 59
- Figura 21.** Estrutura secundária da arginina quinase de 37 kDa identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, composta por cadeias α -hélices (verde), folha- β pregueada (celeste) e alças livres (cinza). 60
- Figura 22.** Figura 20. Três vistas diferentes do modelo tridimensional da arginina quinase de 37 kDa (Uniprot ID: A0A0K0EZR7) em representação tipo ribbons mostrando as diferentes estruturas secundárias (esquerda) e em representação tipo molecular surface (direita). O modelo mostra o início (MET 1) e o fim (ALA 331) da cadeia polipeptídica e a localização dos nove epítomos antigênicos lineares identificados pela ferramenta Bepipred 1.0 (vermelho) que se detalham na Figura 18. 61
- Figura 23.** Reconstrução filogenética da enolase de 47 kDa de *S. venezuelensis* (vermelho) e sua relação com outros homólogos presentes em outros nematódeos, cestódeos, trematódeos, mamíferos e fungos. Uma sequência de enolase da bactéria *Escherichia coli* foi incluída como referência. O fenograma inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA). 62
- Figura 24.** Alinhamento múltiplo de sequências similares ao sítio de união do plasminogênio presente em *S. pneumoneae* (*), identificada tanto na enolase de 47 kDa de iL3 de *S. venezuelensis* (vermelho), quanto em homólogos de outras espécies de helmintos, protozoários, bactérias, fungos e mamíferos. Os aminoácidos altamente conservados são mostrados em azul escuro e os medianamente conservados, em azul claro. O código Uniprot de cada proteína está descrita à esquerda do nome científico de cada espécie. 65
- Figura 25.** Estrutura secundária da enolase de 47 kDa, identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, composta por cadeias α -hélices (verde), folha- β pregueada (celeste) e alças (cinza). O quadro vermelho indica a sítio de união ao plasminogênio, similar a sequências encontradas em enolases de outros organismos patogênicos. 66
- Figura 26.** Três vistas diferentes do modelo tridimensional da enolase de 47 kDa de iL3 de *S. venezuelensis* (Uniprot ID: A0A0K0FKU3) em representação tipo ribbons (esquerda) mostrando as diferentes estruturas secundárias e em representação tipo molecular surface (direita). O modelo mostra o início (MET 1) e o fim (LEU 434) da cadeia polipeptídica e a localização do sítio de união ao plasminogênio (lilás). 67
- Figura 27.** Alinhamento múltiplo das seis proteínas de domínio CAP identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, indicando o peptídeo sinal (quadro vermelho), o domínio transmembrana (quadro amarelo) e o domínio CAP (sublinhado em verde). Cada sequência de proteína possui o código Uniprot, o peso molecular e o número total de aminoácidos. 68
- Figura 28.** Reconstrução filogenética das seis proteínas de domínio CAP identificadas nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua similaridade com o antígeno recombinante NIE e com a proteína GAPR-1 presente no ser humano (Q9H4G4) e no camundongo (Q9CYL5). As três proteínas CAP potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$) foram enquadradas em vermelho. O fenograma inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA). 70
- Figura 29.** Alinhamento múltiplo do domínio CAP das proteínas A0A0K0FXA8, A0A0K0FJA1 identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua relação de similaridade

com o antígeno recombinante NIE. O gráfico superior mostra as regiões conservadas de aminoácidos entre as três proteínas e os quatro subdomínios ou sítios conservados do domínio CAP (CAP1, CAP2, CAP3 e CAP4), bem como a estrutura secundária típica do domínio CAP (cadeias α - β - α). O gráfico inferior mostra a reconstrução filogenética entre os domínios CAP das proteínas A0A0K0FXA8 e A0A0K0FJA1, baseado no grau de identidade com respeito ao antígeno recombinante NIE (expressado em porcentagem). A proteína CAP A0A0K0G1T0 foi incluída como referencia da distancia filogenética.

71

Figura 30. Alinhamento múltiplo dos domínios CAP das proteínas PRY (PRY1_YEAST) e Tablysin-15(F8QQG5_TABYA) e as cinco proteínas com domínio CAP e com peptídeo sinal, identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. No gráfico pode observar a distribuição de aminoácidos preferencialmente hidrofóbicos (asterisco vermelho) que interveem na união e captura de ácidos graxos e leucotrienos (Xu et al. 2012). O sítio de união a esteróis (caveolin-binding motif, CBM) se encontra ressaltado com um quadro lilás.

72

Figura 31. Modelo tridimensional da forma madura da proteína CAP A0A0K0FXA8, identificada nos produtos E/S-RPMI de iL3 de *S. venezuelensis*, em representação tipo molecular surface (A) e em representação tipo ribbons (B) mostrando as diferentes estruturas secundárias e as porções N-terminal e C-terminal da proteína, a região central de união ou captura de ácidos graxos e leucotrienos (vermelho), uma região de união a esteróis (azul) e a sequencia de união à integrina α Ib β 3 “KGD” (verde).

73

Figura 32. Detalhe da cavidade dentro do domínio CAP da proteína A0A0K0FXA8 (estrutura tipo ribbons), formada pelas cadeias α -hélice 1, 3 e 4, onde pode se observar a presença de aminoácidos apolares hidrofóbicos (vermelho) involucrados na captura e união de ácidos graxos e leucotrienos. À direita, estão detalhados quais aminoácidos participam no reconhecimento e união de ácidos graxos e leucotrienos.

74

Figura 33. Sobreposição das estruturas tridimensionais dos domínios CAP da proteína tablysin-15 (PDB: 3U3U; celeste) e a proteína A0A0K0FXA8 (cinza) mostrando os aminoácidos hidrofóbicos involucrados no reconhecimento e captura do leucotrieno B4 (LTB4)(lilás). Na imagem superior (A), pode se observar distribuição dos aminoácidos involucrados, em três vistas diferentes (frente, esquerda e direita). Na imagem inferior, se mostra ao detalhe os nomes de todos os aminoácidos involucrados no reconhecimento e captura do leucotrieno.

75

Figura 34. Detalhe da região de união a esteróis presente na proteína CAP A0A0K0FXA8, localizada entre as cadeias α -hélice 3 e 4, na parte inferior e posterior a cavidade de reconhecimento de ácidos graxos e captura de leucotrienos (A), donde pode se observar a presença de aminoácidos hidrofóbicos (azul) que formam parte do sítio de união a esteróis (B). Além disso, é possível que os aminoácidos TYR251 e VAL255, presentes no final da porção C-terminal da proteína, estejam também involucrados na união a esteróis (C).

76

Figura 35. Detalhe da parte superior da estrutura tridimensional (tipo ribbons) da proteína CAP A0A0K0FXA8, onde se mostra a localização ad sequencia “KGD” (A), entre as cadeias folha- β pregueada 3 e 4. A sequência “KGD” se encontra situado numa região exposta e livre (C) para reconhecer e se ligar à integrina α Ib β 3, presente nas plaquetas e inibir agregação plaquetária. A figura também mostra uma representação tridimensional da sequencia “KGD” em estilo molecular surface (B).

77

- Figura 36.** Alinhamento múltiplo das sequências das duas proteínas 14-3-3 identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua similaridade com os homólogos presentes no ser humano (P63104), camundongo (P63101) e rato (P63102). A imagem também mostra a estrutura secundária das proteínas 14-3-3, caracterizada por uma predominância de cadeias α -hélice, bem como as regiões altamente conservadas (azul escuro) e medianamente conservadas (azul claro). 78
- Figura 37.** Reconstrução filogenética baseada no alinhamento múltiplo das proteínas 14-3-3 (Figura 32), mostrando que a proteína A0A0K0FYU5 possui maior identidade com seus homólogos presentes no ser humano (Uniprot: P63104), camundongo (Uniprot: P63101) e rato (Uniprot: P63102). 79
- Figura 38.** Modelo tridimensional tipo ribbons das proteínas 14-3-3 A0A0K0FYU3 e A0A0K0FYU5 identificadas nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. As proteínas 14-3-3 presente no ser humano (PDB: 6ZCJ) e no camundongo (PDB: 7EXE) foram representados, na parte superior da imagem, como referências. A proteína A0A0K0FYU3 possui ao menos duas cadeias α -hélices adicionais (corados em laranja). O modelo tridimensional também mostra o início e o termino da cadeia polipeptídica. 80
- Figura 39.** Reconhecimento do peptídeo de nove aminoácidos (verde) contendo uma fosfotreonina (laranja), derivado da proteína BLNK, pela proteína 14-3-3 humana (celeste) e pela proteína A0A0K0FYU5 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho. 82
- Figura 40.** Reconhecimento do peptídeo de nove aminoácidos (verde) contendo uma fosfotreonina (laranja), derivado da proteína BLNK, pela proteína 14-3-3 humana (celeste) e pela proteína A0A0K0FYU3 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho. 82
- Figura 41.** Reconhecimento do peptídeo de sete aminoácidos (verde) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína I κ B α , pela proteína 14-3-3 humana (lilás) e pela proteína A0A0K0FYU5 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho. 84
- Figura 42.** Reconhecimento do peptídeo de sete aminoácidos (verde) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína I κ B α , pela proteína 14-3-3 humana (lilás) e pela proteína A0A0K0FYU3 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho. 84
- Figura 43.** Reconhecimento do peptídeo de dez aminoácidos (lilás) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína SLP76, pela proteína 14-3-3 humana (verde) e pela proteína A0A0K0FYU5 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo

estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

86

Figura 44. Reconhecimento do peptídeo de dez aminoácidos (lilás) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína SLP76, pela proteína 14-3-3 humana (verde) e pela proteína A0A0K0FYU3 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo molecular surface (A e B), quanto no modelo estrutural tipo ribbons (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Separação dos produtos de E/S de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> mediante eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.	26
Tabela 2	Reatividade das amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, indivíduos saudáveis e pacientes com outras helmintíases contra os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> , determinados pelo teste ELISA-IgG.	29
Tabela 3	Bandas antigênicas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> detectadas por anticorpos IgG do soro controle (+) mediante <i>Western-blotting</i> .	30
Tabela 4	Distribuição da reatividade das bandas antigênicas dos produtos E/S-RPMI nas amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, indivíduos saudáveis e pacientes com outras helmintíases, detectadas pelo <i>Western-blotting</i> .	32
Tabela 5	Bandas antigênicas dos produtos de E/S de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> que foram reconhecidas por soros de pacientes com outras helmintíases.	33
Tabela 6	Identificação de proteínas nas três frações antigênicas (LMW, IMW e HMW) dos produtos E/S-RPMI de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> por espectrometria de massas.	46
Tabela 7	Identificação de proteínas nas três frações antigênicas (LMW, IMW e HMW) dos produtos E/S-PBS de iL3 de <i>S. venezuelensis</i> por espectrometria de massas.	53
Tabela 8	Identificação de regiões potencialmente antigênicas e epítomos lineares na arginina quinase de 37 kDa por três ferramentas bioinformáticas.	60
Tabela 9	Identificação de regiões potencialmente antigênicas e epítomos lineares da enolase de <i>S. venezuelensis</i> por três ferramentas bioinformáticas.	64
Tabela suplementar 1	Proteínas identificadas nos produtos E/S-RPMI de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> mediante espectrometria de massas	115
Tabela suplementar 2	Proteínas identificadas nos produtos E/S-PBS de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> mediante espectrometria de massas	120
Tabela suplementar 3	Classificação <i>Gene Ontology</i> das proteínas identificadas nos produtos E/S-RPMI de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> mediante espectrometria de massas	125
Tabela suplementar 4	Classificação <i>Gene Ontology</i> das proteínas identificadas nos produtos E/S-PBS de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> mediante espectrometria de massas	130

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Definição e epidemiologia da estrogiloidíase.....	2
1.2. Resposta imune contra o <i>Strongyloides</i>	4
1.3. Diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase.....	5
1.4. Diagnóstico molecular da estrogiloidíase.....	6
1.5. Diagnóstico imunossorológico da estrogiloidíase.....	6
1.6. Análise proteômica: uma interessante ferramenta para caracterizar as proteínas do <i>Strongyloides</i>	7
1.7. Justificativa do presente estudo.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo principal.....	11
2.2. Objetivos secundários.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Parasitos.....	13
3.2. Obtenção dos produtos de E/S de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i>	13
3.3. Soros humanos.....	14
3.4. Ensaio Imunoenzimático em placas de poliestireno (ELISA) para detecção de anticorpos IgG.....	15
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	15
3.6. Zimografia em gel de poliacrilamida.....	16
3.7. Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE).....	17
3.8. Western blotting para detecção de anticorpos IgG.....	17
3.9. Análise proteômica dos produtos de E/S por espectrometria de massas.....	18
3.10. Análise bioinformática das proteínas identificadas por espectrometria de massas.....	20
3.11. Alinhamento múltiplo de sequências de proteínas.....	21
3.12. Predição de epítomos antigênicos.....	22
3.13. Modelagem molecular e análise estrutural de proteínas.....	22
3.14. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Caracterização dos produtos de E/S de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
4.2. Zimografia dos produtos de E/S de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i>	26
4.3. Detecção de anticorpos IgG por ELISA.....	27
4.4. Detecção de anticorpos IgG por <i>Western-blotting</i>	29
4.5. Eletroforese e <i>Western-blotting</i> bidimensional.....	33
4.6. Análise proteômica dos produtos de E/S de larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i>	42
4.6.1. Análise dos produtos E/S-RPMI por espectrometria de massas e bioinformática.....	42

4.6.2. Espectrometria de massas e análise bioinformática das frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI.....	43
4.6.3. Análise dos produtos E/S-PBS por espectrometria de massas e bioinformática.....	49
4.6.4. Espectrometria de massas e análise bioinformática das frações antigênicas dos produtos E/S-PBS.....	50
4.7. Análise <i>in silico</i> da arginina quinase de 37 kDa.....	56
4.7.1. Detecção de epítomos antigênicos potenciais da arginina quinase de 37 kDa.....	58
4.7.2. Estrutura secundária e modelagem molecular da arginina quinase de 37 kDa.....	60
4.8. Análise <i>in silico</i> da enolase de 47 kDa.....	62
4.8.1. Detecção de epítomos antigênicos potenciais da enolase de 47 kDa.....	63
4.8.2. Identificação do sítio potencial para ligação ao plasminogênio.....	63
4.8.3. Estrutura secundária e modelagem 3D da enolase de 47 kDa.....	65
4.9. Análise <i>in silico</i> das proteínas de domínio CAP.....	68
4.9.1. Análise estrutural da proteína CAP A0A0K0FXA8.....	73
4.10. Análise <i>in silico</i> das proteínas 14-3-3 de iL3 de <i>S. venezuelensis</i>	78
4.10.1. Análise estrutural das proteínas 14-3-3 de iL3 de <i>S. venezuelensis</i>	79
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8. ANEXOS.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e epidemiologia da estrogiloidíase

A estrogiloidíase humana é uma infecção parasitária causada principalmente pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* que possui distribuição mundial, sendo mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais (Bisoffi et al. 2013; Puthiyakunnon et al. 2014). A prevalência global da estrogiloidíase em 2017 foi de aproximadamente 8,1%, correspondendo a mais de 600 milhões de pessoas infectadas no mundo (Figura 1). No Brasil, a prevalência estimada de infecção por *Strongyloides* seria de 11,2% (Buonfrate et al. 2020).

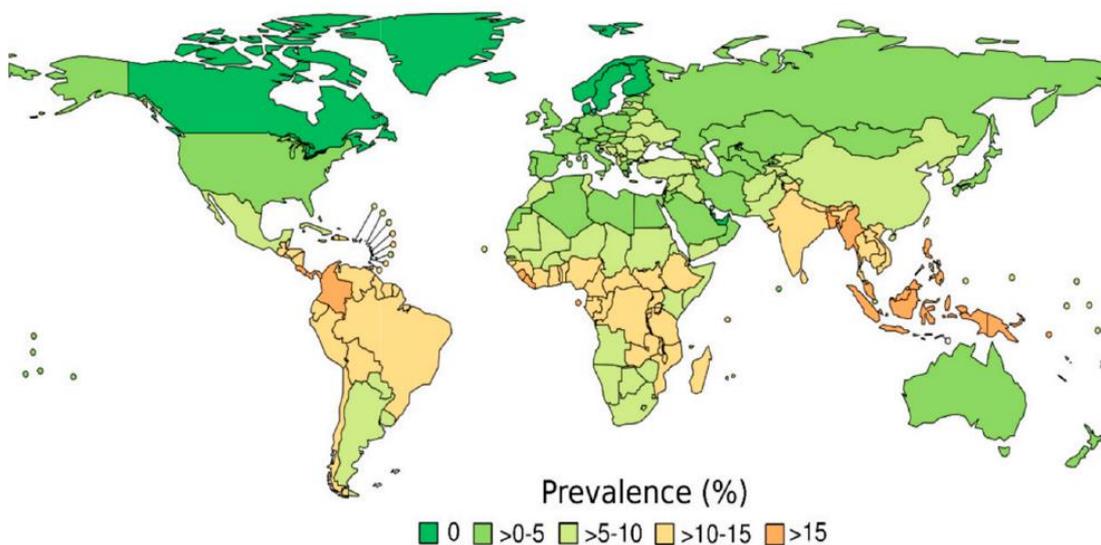


Figura 1. Prevalência mundial estimada da estrogiloidíase no ano 2017, descrito por Buonfrate et al. (2020).

A estrogiloidíase é uma parasitose crônica, frequentemente assintomática, que se inicia uma vez que a larva infectante filarioide (iL3) penetra ativamente a pele humana e migra pelo tecido subcutâneo até alcançar algum vaso sanguíneo para logo entrar na circulação e chegar até os alvéolos pulmonares; as larvas sobem pelo trato respiratório até e a faringe onde são deglutidas para continuar sua migração pelo trato digestório até chegar ao duodeno.

Nesse processo migratório, a iL3 cresce e evolui para fêmea adulta e inicia a postura de ovos mediante partenogênese, na mucosa do duodeno. Os ovos do parasito são albergados na mucosa intestinal onde evoluem para larvas rabditoides não infectantes (L1 e L2) que logo serão eliminadas junto com as fezes para o meio externo. As larvas rabditoides evoluem para iL3, podendo assim infectar um novo

hospedeiro (ciclo direto). No entanto, larvas rabditoides podem evoluir para formas adultas de vida livre (macho e fêmea), que logo se acasalarão para se reproduzir mediante ovipostura que, por sua vez, evoluirão em larvas rabditoides e posteriormente em iL3 (ciclo indireto)(Figura 2). Em alguns casos, as larvas rabditoides que eclodiram no intestino do hospedeiro podem ficar retidas no cólon, podendo evoluir rapidamente para iL3, originando casos de autoinfecção.

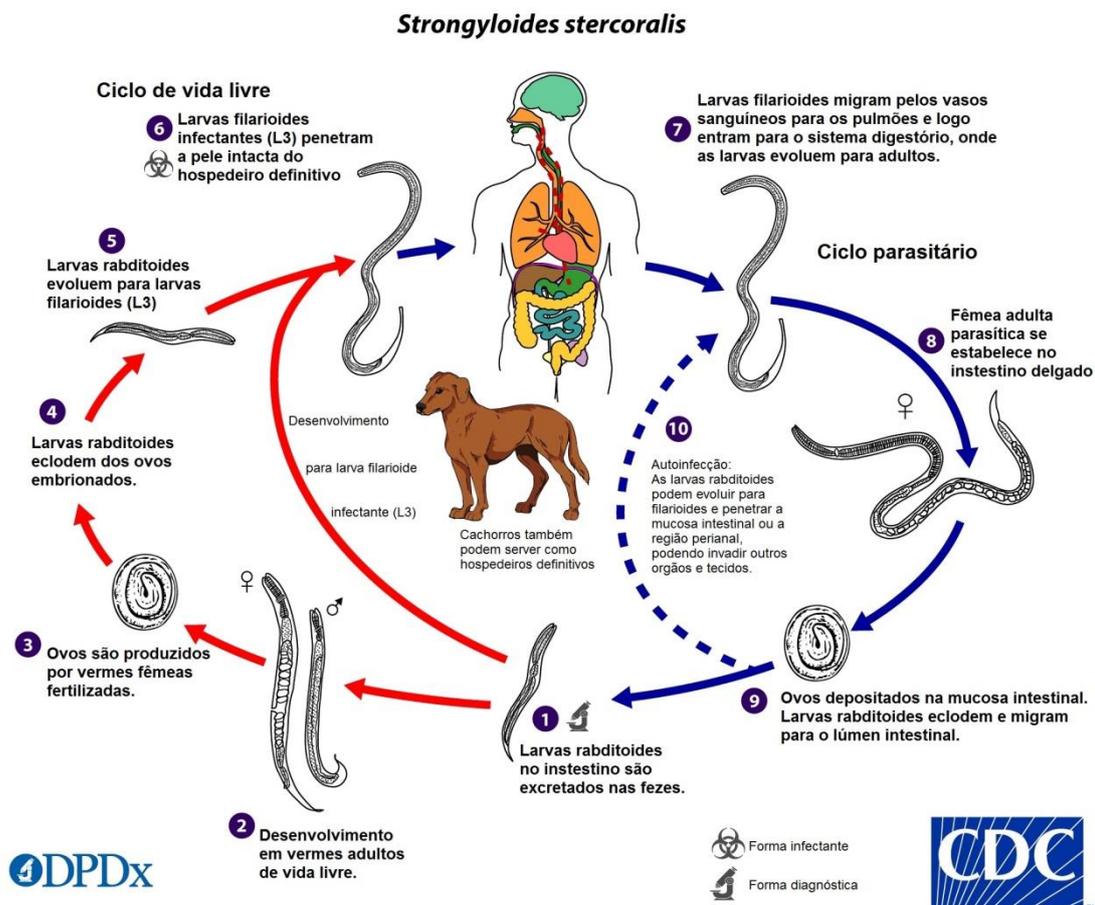


Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico de *S. stercoralis*. Adaptado de: <https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>

A infecção por *Strongyloides* geralmente é crônica e às vezes assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas casos fatais podem ocorrer em pacientes infectados com o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) ou o vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes recebendo corticosteroides ou outras drogas imunossupressoras, bem como em indivíduos alcoólatras, onde os mecanismos regulares de imunidade são prejudicados ou alterados, permitindo que o

parasito se reproduza massivamente com episódios de autoinfecção. Essa condição crítica conhecida como síndrome de hiperinfecção é caracterizada principalmente pela disseminação do parasito para outros órgãos, atingindo uma taxa de mortalidade de 60% a 87% (Vasquez-Rios et al. 2019).

1.2. Resposta imune contra o *Strongyloides*

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel crítico no controle da estrogiloidíase e na prevenção da síndrome de hiperinfecção e disseminação. Semelhante a outras infecções por helmintos, a estrogiloidíase induz uma resposta imune com predominância de linfócitos tipo Th2 (T helper 2), com produção de citocinas, anticorpos IgG e IgE, eosinófilos e mastócitos que participam na expulsão e morte dos parasitos (Weatherhead e Mejia 2014).

No início da infecção, os eosinófilos são ativados e atuam como células apresentadoras de antígeno para estimular a produção de citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-5. A IL-4 induz a mudança de classe de imunoglobulina nos linfócitos B ativados para a produção de anticorpos IgG4 e IgE, que permite a degranulação de mastócitos e aumenta a migração de eosinófilos; a IL-5 estimula o crescimento e ativação de eosinófilos e a IL-8 atrai neutrófilos para ajudar na morte das larvas (Iriemenam et al. 2010). Aproximadamente 75% dos pacientes com estrogiloidíase crônica têm eosinofilia periférica ou níveis elevados de IgE total (Ramanathan e Nutman 2008).

A imunidade protetora contra *Strongyloides* envolve a produção de anticorpos específicos, ativação do complemento, neutrófilos e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos. Pacientes com doença grave demonstraram ter uma diminuição significativa nos níveis de anticorpos e eosinófilos em comparação com indivíduos infectados assintomáticos, sugerindo que tanto os anticorpos quanto os granulócitos desempenham um papel significativo na proteção contra a infecção (Weatherhead e Mejia 2014).

No entanto, a manipulação do sistema imune do hospedeiro pelo parasito permite a sobrevivência do patógeno no trato gastrointestinal do hospedeiro por longos períodos. Por tanto, a interrupção dos mecanismos de resposta imune, tais como a perda da função dos granulócitos, diminuição na produção de anticorpos, diminuição de citocinas chave da resposta tipo Th2, pode provocar uma redução no

controle da densidade de vermes adultos no intestino e predispõe os pacientes à síndrome de hiperinfecção (Ramanathan e Nutman 2008; Weatherhead e Mejia 2014).

Vários estudos têm mostrado que a resposta imune humoral contra *Strongyloides* é caracterizada por elevados níveis de anticorpos IgG, IgE e IgA (Genta e Lillibridge 1989; Rodrigues et al. 2007; Norsyahida et al. 2013; Bosqui et al. 2015). Altos níveis de IgE específica foram encontrados em pacientes imunocompetentes com estrogiloidíase, enquanto níveis mais baixos foram encontrados em pacientes com doença disseminada ou condições de imunossupressão (Rodrigues et al. 2004). Por outro lado, vários autores têm indicado que os anticorpos IgG4 podem desempenhar um papel proeminente em pacientes infectados cronicamente (Genta e Lillibridge 1989; Satoh et al. 1999).

1.3. Diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é usualmente baseado no resultado do exame parasitológico, que compreende a visualização microscópica de larvas do parasito nas fezes do paciente, o qual possui uma baixa sensibilidade. Com o intuito de melhorar essa sensibilidade, várias técnicas de concentração larvária foram desenvolvidas e aplicadas, tais como as técnicas de Moraes, Rugai e a cultura em placa de ágar (Moraes 1948; Rugai et al. 1954; Arakaki et al, 1990; Sato et al. 1995; Bisoffi et al. 2013).

No entanto, um dos principais problemas no diagnóstico parasitológico é a dificuldade para detectar larvas nas fezes de pacientes com infecção crônica e com liberação larval intermitente, sendo necessárias várias amostras para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (Uparanukraw et al. 1999). Embora a cultura em placa de ágar possa ser mais sensível do que os outros métodos parasitológicos tradicionais anteriormente mencionados, é mais demorado (Hirata et al. 2007). Ademais, a obtenção de amostras fecais de boa qualidade tem sido um problema para o diagnóstico parasitológico, em função de uma quantidade insuficiente ou de más condições de preservação para sua posterior análise laboratorial, podendo comprometer assim os resultados. Por outro lado, a grande possibilidade de hiperinfecção e disseminação pós-transplante em aqueles pacientes infectados com *S.*

stercoralis, justificam a procura de uma alternativa diagnóstica que seja rápida para poder administrar tratamentos mais eficazes e precoces contra a estrogiloidíase.

1.4. Diagnóstico molecular da estrogiloidíase

Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são ferramentas de prioridade no campo do diagnóstico moderno e também foram aplicados para o diagnóstico da estrogiloidíase com o intuito de atingir uma maior sensibilidade e especificidade. No entanto, diferentes estudos têm mostrado uma maior ou menor precisão em comparação com os métodos tradicionais parasitológicos baseados na microscopia. Num estudo de meta-análise publicado por Buonfrate et al. (2018), demonstrou-se que a PCR possui uma alta especificidade (93 - 95%) quando comparado com o teste de referência parasitológico. No entanto, uma sobrestimação desta especificidade pode acontecer em casos de resultados falsos positivos (uma amostra fecal PCR positiva sendo negativa para os testes tradicionais parasitológicos). Por outro lado, a sensibilidade dos testes moleculares pode ser insatisfatória: 56% de sensibilidade quando o Real-Time PCR (qPCR) foi comparado a qualquer outro método tradicional, incluindo a sorologia, e 71% de sensibilidade quando os resultados de qualquer técnica de PCR foram comparados apenas com os métodos parasitológicos baseados na microscopia. Possíveis explicações para essa baixa sensibilidade seriam a eliminação irregular de larvas observada na estrogiloidíase crônica e ou certa incapacidade das técnicas de extração e obtenção de DNA do parasito. Portanto, as técnicas de PCR podem enfrentar o mesmo problema que as técnicas parasitológicas convencionais. Na verdade, a PCR não se mostrou superior ao método de Baermann ou à cultura em placa de ágar, particularmente em infecções de baixa densidade, onde a excreção larval é baixa e irregular (Requena-Méndez et al. 2013). Além disso, uma das causas da baixa sensibilidade da PCR pode ser a pequena quantidade de amostra fecal analisada, particularmente relevante quando as larvas raramente são eliminadas nas fezes (Requena-Méndez et al. 2014; Buonfrate et al. 2018).

1.5. Diagnóstico sorológico da estrogiloidíase

As técnicas imunológicas mediante a detecção de anticorpos contra os antígenos do parasito apresentam-se como uma importante alternativa ao diagnóstico

parasitológico já que conseguem superar a baixa sensibilidade dos exames parasitológicos (Olsen et al. 2009). Assim, os testes imunossorológicos para detecção de anticorpos IgG específicos pelo teste de ELISA apresentam alta sensibilidade, porém com ocorrência de reatividade cruzada em indivíduos com outras infecções helmínticas devido provavelmente ao uso de extratos somáticos do parasito (Lindo et al. 1994; Machado et al. 2003). Por outro lado, a dificuldade na obtenção de larvas iL3 de *S. stercoralis* como fonte de antígeno tem sido uma das principais limitações no imunodiagnóstico da estrogiloidíase.

Vários autores têm sugerido a utilização de antígenos heterólogos provenientes de outras espécies, tais como o *Strongyloides venezuelensis* ou *S. ratti* que podem ser facilmente mantidas no laboratório e possuem uma composição antigênica similar aos antígenos de *S. stercoralis*, permitindo assim a sua utilização no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Grove e Blair 1981; Machado et al. 2003; Rodrigues et al. 2004). Assim, a identificação e caracterização de antígenos homólogos ou heterólogos das diferentes formas evolutivas de espécies de *Strongyloides* representam uma boa alternativa para o desenvolvimento de testes imunológicos.

1.6. Análise proteômica: uma interessante ferramenta para caracterizar as proteínas de *Strongyloides*

Uma interessante estratégia para a identificação e caracterização de proteínas de espécies de *Strongyloides* é através da análise proteômica, que estuda em forma sistemática o conjunto de proteínas e suas isoformas (chamado de proteoma) de um organismo e que foram expressas em um momento determinado.

A análise proteômica utiliza conjunto de técnicas de separação e identificação de proteínas, tais como a eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática. Este tipo de análise, conhecida como “bottom-up proteomics”, se inicia com uma extração adequada de proteínas da amostra de interesse e uma subsequente separação ou fracionamento mediante eletroforese (unidimensional ou bidimensional) ou cromatografia líquida. As proteínas separadas ou fracionadas são logo digeridas por peptidases conhecidas (tripsina ou quimotripsina) para gerar um conjunto definido de peptídeos; estes peptídeos são posteriormente separados e

analisados mediante cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS) (Schmidt et al. 2014).

Por outro lado, também existe a análise “Shotgun” onde o extrato de proteínas da amostra é diretamente digerido sem prévia separação e o conjunto de peptídeos resultantes são diretamente analisados através da LC-MS (Zhang et al. 2013). Os resultados gerados pela espectrometria de massas fornecem informações sobre a sequência do peptídeo e a qual proteína ele pertence. Assim, os dados de sequências de peptídeos são confrontados contra um banco de dados predefinido de proteínas traduzidas a partir de dados genômicos.

A análise proteômica é uma estratégia para estudar os padrões de expressão proteica de organismos utilizando bancos de dados da mesma espécie ou de espécies relacionadas (Chambers et al. 2000). Os avanços na proteômica tornaram possível a caracterização rápida do conteúdo proteico de diferentes espécies de parasitos, incluindo seus produtos de excreção/secreção (E/S) e moléculas de superfície (Barrett et al. 2000).

Os resultados da análise proteômica podem acrescentar o nosso conhecimento sobre a biologia e a resposta imune contra o parasito, o que pode levar à descoberta de marcadores diagnósticos ou candidatos a vacinas contra a infecção por parasitos helmintos (Robinson et al. 2009; Sotillo et al. 2015; Sotillo et al. 2016; Vendelova et al. 2016).

Alguns autores utilizaram a análise proteômica para caracterizar as proteínas de *S. stercoralis* (Marcilla et al. 2010; Rodpai et al. 2016; Rodpai et al. 2017), *S. ratti* (Soblik et al. 2011) e *S. venezuelensis* (Tsuji et al. 1993; Corral et al. 2017; Maeda et al. 2019; Fonseca et al. 2020), encontrando uma série de proteínas que podem ter relação com a regulação da resposta imune do hospedeiro e aplicação no imunodiagnóstico.

1.7. Justificativa do presente estudo

Os produtos de E/S liberados pelos parasitos constituem proteínas importantes que desempenham funções biológicas e de imunomodulação dentro do hospedeiro, podendo representar até 20% do proteoma do organismo (Nagaraj et al. 2008). Ao entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro, os produtos de E/S também constituem uma valiosa fonte de antígenos para o imunodiagnóstico. Nesse

sentido, Cunha et al. (2017) verificaram que os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, quando utilizados na técnica de ELISA, resultaram ser mais sensíveis e específicos que os extratos totais do parasito na detecção de anticorpos em pacientes com estrogiloidíase, o que pode ter uma boa aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Embora existam informações relevantes sobre a caracterização dos produtos de E/S de *S. stercoralis* (Brindley et al. 1988; Brindley et al. 1995; Varatharajalu et al. 2011), *S. ratti* (Mimori et al. 1987; Northern e Grove 1987; Soblik et al. 2011) e *S. venezuelensis* (Maeda et al. 2019), até agora não existe informação sobre a caracterização imunoproteômica dos produtos de E/S de *S. venezuelensis*. Por tanto, o objetivo principal do presente estudo foi caracterizar os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* através da análise imunoproteômica e avaliar a sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Caracterizar o excretoma/secretoma de iL3 de *S. venezuelensis* através da análise imunoproteômica e sua aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

2.2. Objetivos secundários

1. Obter *in vitro* os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*.
2. Analisar os produtos de E/S de iL3 de *Strongyloides venezuelensis* mediante eletroforese unidimensional e bidimensional.
3. Avaliar a capacidade dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* para detectar anticorpos IgG em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, pacientes com outras parasitoses e indivíduos saudáveis, através das técnicas de ELISA e Western blotting.
4. Identificar quais componentes dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* poderiam ter importância imunodiagnóstica na técnica de Western blotting.
5. Analisar os produtos de E/S de iL3 de *Strongyloides venezuelensis* através da espectrometria de massas, fazendo ênfase naquelas frações proteicas que reagiram com os anticorpos IgG humanos.
6. Aplicar ferramentas de bioinformática nas sequências de proteínas contidas nos produtos de E/S de *S. venezuelensis* e identificar aquelas que possam ter potencial utilidade no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parasitos

O parasito *S. venezuelensis* vem sendo mantido em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar por aproximadamente uma década no Laboratório de Investigação Médica 6 (LIM06) “Imunopatologia da Esquistossomose” do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC, FM-USP), com sede no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Para manutenção do ciclo do parasito, quatro ratos machos de 30 dias de idade foram infectados experimentalmente com 20.000 iL3 de *S. venezuelensis* por via subcutânea. Seis dias após infecção, as fezes do rato (que contêm ovos do parasito) foram coletadas e amolecidas com água destilada por aproximadamente 30 minutos; posteriormente foram misturadas com duas partes de carvão animal granulado e colocadas em frascos pequenos de vidro de boca ampla (volume aproximado de 200 mL), tampadas levemente com um pedaço de papel alumínio e incubadas a 28°C por 48 a 72 horas para o desenvolvimento das iL3, as quais foram coletadas utilizando a técnica modificada de Baermann, descrita por Lok (2007). As iL3 foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,01 mol/L, pH 7,2) e contadas por microscopia óptica.

As larvas foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,25% em PBS durante cinco minutos (Martins et al. 2000) e imediatamente centrifugadas a 4.000 x g durante um minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as larvas foram lavadas três vezes com PBS contendo 100 U/mL de penicilina e 20 µg/mL de gentamicina, a 4.000 x g durante um minuto. As larvas foram coletadas e utilizadas para a produção *in vitro* de produtos de E/S.

3.2. Obtenção dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis*

Os produtos de E/S foram produzidos *in vitro* e coletados seguindo os procedimentos descritos por Soblik et al. (2011) e Cunha et al. (2017), com algumas modificações. Aproximadamente 30.000 larvas iL3 foram transferidas para tubos de centrifuga de plástico com tampa, de 15 mL, contendo 8 mL de meio de cultura celular RPMI 1640 suplementado com HEPES 10 mM, 100 U/mL de penicilina e 20 µg/mL de gentamicina. Os tubos foram incubados durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Com o intuito de saber se as iL3 de *S. venezuelensis* são capazes de liberar produtos de E/S em condições fisiológicas mínimas, elas também

foram incubadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,01 M suplementado com os mesmos antibióticos. Após incubação, os sobrenadantes de cada meio foram coletados mediante centrifugação a 4.000 x g durante 5 minutos e logo foram misturados com 10 µL/mL do coquetel de inibidor de proteases (ULTRA Mini cOmplete™, Roche, Alemanha).

Todos os sobrenadantes coletados de cada tipo de meio (RPMI 1640 ou PBS) foram misturados e o volume total obtido (500 mL) foi concentrado 100 vezes através do sistema Amicon® utilizando uma membrana-filtro de 3 kDa (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda).

O conteúdo proteico dos produtos de E/S obtidos foi quantificado utilizando o kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

3.3. Soros humanos

Para avaliar a capacidade dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS para detectar anticorpos IgG mediante os testes ELISA e *Western-blotting*, foram utilizadas 71 amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo de *S. stercoralis* (Grupo 1); 105 soros de indivíduos saudáveis, com diagnóstico negativo tanto para *S. stercoralis* quanto para outras parasitoses (Grupo 2) e 84 soros de pacientes com outras helmintíases (Grupo 3), os que incluem 17 pacientes com ascaridíase, 7 pacientes com ancilostomíase, 2 pacientes com enterobíase, 20 pacientes com trichuríase, um paciente com teníase, 11 pacientes com neurocisticercose, 13 pacientes com himenolepíase, 5 pacientes com difilobotríase, 6 pacientes com fasciolose, e 2 pacientes com esquistossomose. Estes pacientes foram diagnosticados por métodos parasitológicos, com exceção dos pacientes com neurocisticercose que foram diagnosticados através de imagens de ressonância magnética e sorologia positiva para anticorpos IgG mediante o teste de *western-blotting*.

Todas as amostras pertencem à soroteca do LIM06 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC, FM-USP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC, FM-USP (Protocolo nº 4.012.674, ano 2019).

3.4. Ensaio Imunoenzimático em placas de poliestireno (ELISA) para detecção de anticorpos IgG

O teste ELISA para detecção de anticorpos IgG em amostras de soro foi desenvolvido baseado no procedimento descrito por Toledo et al. (2019). Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas durante a noite com 1,0 µg/ml (100 µl/poço) dos produtos E/S-RPMI ou E/S-PBS diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0.1% do detergente Tween 20 (PBS-T), bloqueadas com PBS-T contendo 5% leite desnatado durante 2 horas à temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS-T, como já foi descrito.

As amostras de soro a testar e os soros padrões negativos e positivos foram diluídos 1/200 em solução de bloqueio e incubados por 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e, em seguida, foi adicionado em cada poço anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluído 1/10.000 em solução de bloqueio e incubados por 45 minutos a 37°C.

Após um novo ciclo de três lavagens, foi adicionada uma solução substrato-cromogênica peróxido de hidrogênio e TMB (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) e incubado por 7 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N.

Os valores de absorbância foram determinados em leitor de ELISA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) no comprimento de onda de 450 nm. Como controle da reação, foi utilizado um soro padrão positivo (*pool* de amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase) e um soro padrão negativo (*pool* de amostras de soro de indivíduos saudáveis) em todos os ensaios.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis*, foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida seguindo a metodologia de Laemmli (1970). Os produtos de E/S foram diluídos em tampão de amostra 5X (concentração final de Tris-HCl 0,01M; pH 6,8; SDS 1%, ureia 6%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 3,2%, azul de bromofenol 0.005%) e incubados a 95°C por 5

minutos; em seguida, foram aplicados em géis de poliacrilamida 12% (75 mm x 80 mm), numa concentração de 1,50 µg por milímetro de gel. A eletroforese foi realizada numa voltagem constante de 80 Volts por 10 minutos e logo em 150 Volts até que o azul de bromofenol atingisse o final do gel (aproximadamente 85 minutos). Como controle de migração foi utilizado um padrão de peso molecular (PM) de proteínas de referência (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA). O gel foi corado com nitrato de prata (Shevchenko et al. 1996) para sua posterior documentação e o PM das bandas proteicas dos produtos de E/S foram determinadas em referência ao padrão de PM, como descrito por Matsumoto et al. (2019).

3.6 Zimografia em gel de poliacrilamida

A presença de proteases nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* foi avaliada mediante zimografia segundo a metodologia descrita por Rebello et al. (2012), com algumas modificações. Aproximadamente 5 µg dos produtos de E/S (E/S-RPMI ou E/S-PBS) foram misturados com tampão de amostra para zimografia 5X (Tris-HCl 0,05M, pH 6,8; SDS 5%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.01%), incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e imediatamente aplicadas no gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina 0,1%. As condições de eletroforese foram as mesmas, como anteriormente descritas. O padrão de PM Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) foi utilizado como controle da migração.

Após eletroforese, o gel de poliacrilamida foi lavado três vezes durante 20 minutos cada vez com o detergente Triton X-100 2% em água destilada, e logo com tampão de incubação (Tris-HCl 0,05M, pH 7,5) durante 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado a 37°C durante 18 horas em tampão de incubação contendo CaCl₂ 0.001M. Após incubação, o gel foi corado com azul de Coomassie R-250 0,2% em metanol 40% e ácido acético 10% durante 1 hora, em constante agitação, e logo descorado com uma solução de etanol 30% e ácido acético 5%.

Com o intuito de avaliar o tipo de protease presente nos produtos de E/S, foram testados inibidores específicos para cisteínoproteases (Iodoacetamida), serinoproteases (PMSF) e metaloproteases (EDTA), que foram incubados com os

produtos de E/S à concentração final de 0.01M durante 30 minutos à temperatura ambiente, antes da análise de zimografia.

3.7. Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE)

Os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* (E/S-RPMI ou E/S-PBS) foram separados de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) mediante focalização isoelétrica (IEF) e depois de acordo com seu PM mediante SDS-PAGE seguindo a metodologia descrita por Sotillo et al. (2014).

Aproximadamente 100 µg dos produtos de E/S foram previamente tratados com o 2D Clean-Up kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e logo ressuspendidos em tampão de reidratação (8M ureia, 2M tiourea, 3% CHAPS, 40mM DTT, 2% pharmalyte pH 3-10 e 10% glicerol) e carregados em fitas de focalização isoelétrica de 7 cm (Immobiline DryStrip gel com um pI 3-10); as fitas contendo os produtos de E/S foram incubadas à temperatura ambiente por 20 horas e cobertos com óleo mineral e logo foram eletrofocalizadas utilizando o sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 500 Volts por 30 minutos, 1000 Volts por 30 minutos e 8.000 Volts por 6 horas.

Após IEF, as fitas contendo os produtos de E/S foram equilibradas por 15 minutos em solução tampão de equilíbrio (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol) contendo DTT (10 mg/ml) e logo por outros 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo Iodoacetamida (25 mg/ml) para uma completa redução e alquilação das pontes dissulfeto.

As fitas já tratadas foram finalmente separadas por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 10%, nas condições de eletroforese já descritas anteriormente. Com o intuito de detectar os *spots* das diferentes bandas dos produtos de E/S, os géis foram corados com nitrato de prata (Shevchenko et al. 1996).

3.8. Western blotting para detecção de anticorpos IgG

Os produtos E/S-RPMI ou E/S-PBS, separados inicialmente por SDS-PAGE, foram transferidos eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), de 75mm x 80 mm, à voltagem constante de 100V, durante 2 horas a 4°C num aparelho Mini Trans-Blot II (BioRad). Em seguida, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas

transferidas foram lavadas por 30 minutos com PBS-T, cortadas em fitas de 3,5 mm de largura e bloqueadas com leite desnatado 5% em PBS-T, durante 1 hora à temperatura ambiente.

As amostras de soro a ser testadas foram diluídas 1/100 em solução de bloqueio e incubadas com as fitas overnight a 4°C em constante agitação. Após incubação, as fitas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-T, e em seguida, foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpos anti-IgG humano conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) diluídos 1/2.000 em solução de bloqueio. Após três lavagens de 5 minutos com PBS-T, as fitas foram incubadas com solução cromogênica (3,3'-tetraidroclorato de diaminobenzidina 0,0005%; peróxido de hidrogênio 0,01% em PBS, pH 7,2) por 3 minutos à temperatura ambiente e finalmente lavadas três vezes com água destilada para interromper a reação enzimática.

Um resultado positivo foi evidenciado pela presença de bandas de cor marrom escuro. Todos os volumes das amostras e reagentes empregados no ensaio foram de 800 µL. Como controles da reação, foi utilizado um soro padrão positivo e um soro padrão negativo em todos os ensaios.

No caso da eletroforese bidimensional, as mesmas condições de transferência e ensaio imunoenzimático foram utilizadas para a imunodeteção dos *spots* específicos com o auxílio do soro padrão positivo ou soro padrão negativo à mesma diluição, porém com um volume maior de incubação (10 mL), bem como os outros reagentes utilizados no ensaio.

Ademais, com o intuito de identificar *spots* que possuem reatividade cruzada com outros tipos de helmintíases, foram preparados um *pool* de soros de indivíduos infectados com outros nematódeos, cestodes e trematódeos, e incubados com as membranas de nitrocelulose, como já foi anteriormente descrito.

3.9. Análise proteômica dos produtos de E/S por espectrometria de massas

Após SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata, as bandas antigênicas que apresentaram forte reatividade com soro controle positivo foram localizadas no gel de poliacrilamida e cortadas em pequenos fragmentos de 2 mm com auxílio de bisturis descartáveis e, em seguida, depositadas em tubos plásticos de 1,5 mL. Com o intuito de identificar aquelas proteínas não antigênicas, foi realizado uma análise

completa dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS previamente separados em gel poliacrilamida, os quais foram cortados em oito frações de acordo como o PM do padrão de referência.

Os fragmentos de gel foram lavados por 15 minutos em água ultrapura e depois incubados em solução descolorante (partes iguais de ferrocianeto de potássio 30 mM e tiosulfato de sódio penta hidratado 100 mM) até o desaparecimento da coloração e logo foram lavados por 15 minutos em água ultrapura. Os fragmentos de gel foram lavados três vezes com tampão bicarbonato de amônio 50 mM contendo 40% de acetonitrila (ACN) por 30 minutos e logo foram desidratados com 100% de ACN por 15 minutos.

Os fragmentos de gel foram reduzidos durante 30 minutos com ditiotretitol 10 mM a 37°C e depois foram alquilados durante 30 minutos com iodoacetamida 55 mM no escuro. Os fragmentos foram desidratados com ACN pura e logo evaporado por centrifugação ao vácuo. Os fragmentos de gel desidratados foram hidratados por 45 minutos a 4°C em solução de tripsina de grau de sequenciamento (300 ng por fração; Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). Os fragmentos de gel hidratado foram cobertos com bicarbonato de amônio 50 mM e incubados a 37°C por 18 horas. A digestão enzimática foi interrompida pela adição de ácido fórmico a 10% e todos os sobrenadantes contendo os peptídeos trípticos foram transferidos para novos tubos plásticos de 1,5 ml.

Os pedaços de gel contendo peptídeos foram extraídos ainda três vezes mais com bicarbonato de amônio 50 mM contendo 40% de acetonitrila e todos os sobrenadantes foram misturados e logo evaporados por centrifugação ao vácuo e dissolvidas em 2% de ACN antes da análise.

As suspensões peptídicas foram analisadas por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) em um instrumento ESI-IT-TOF acoplado a um UPLC 20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (alíquotas de 15 µL) foram carregadas em uma coluna C18 (Kinetex C18, 5 µm; 50 × 2,1 mm) e fracionadas por um gradiente binário empregando como solventes: 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e ACN contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente B). Uma gradiente de eluição de 0 - 45% B foi aplicado por 120 minutos a um fluxo constante de 0,2 mL/min após eluição isocrática inicial por 5 minutos. Os eluatos foram

monitorados por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA antes de serem injetados no espectrômetro de massa.

Os dados brutos gerados no equipamento LC-MS LCD Shimadzu foram convertidos em arquivos mzXML pela ferramenta LCM Solution (PRIDE) e depois carregados no programa Peaks Studio V 7.0 (BSI, Canadá). Os dados foram processados de acordo com os seguintes parâmetros: MS e massa de erro MS/MS foram 0,1 Da; oxidação de metionina e carbamidometilação como modificação variável e fixa, respectivamente; tripsina como enzima de clivagem; clivagens perdidas máximas = 3, PTMs variáveis máximas por peptídeo = 3 e clivagem não específica (ambas); a taxa de falsa descoberta foi ajustada para $\leq 0,5\%$ e apenas proteínas com pontuação de confiança de peptídeo ($-10\lg P$) ≥ 20 e contendo pelo menos 1 peptídeo único foram consideradas no presente estudo. Maiores detalhes sobre o processamento de dados no programa Peaks Studio V 7.0 podem ser encontrados no link: <https://www.bioinfor.com/wp-content/uploads/2016/12/PEAKS7Manual.pdf>

3.10. Análise bioinformática das proteínas identificadas por espectrometria de massas

As proteínas foram identificadas pelo programa Peaks Studio V 7.0 (BSI, Canadá) utilizando o banco de dados UniProtKB (Taxid: 75913 - *Strongyloides venezuelensis*). As proteínas identificadas foram analisadas pelo sistema *Gene Ontology* (GO) e categorizadas de acordo com sua função molecular, processo biológico e componente celular utilizando o banco de dados UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) e, alguns os casos, o programa QuickGO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>).

A ferramenta bioinformática online SignalP versão 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) foi utilizada para identificar a presença do peptídeo sinal N-terminal, típico da via secretora clássica, e a ferramenta online TMHMM versão 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) foi utilizada para identificar a presença de hélices transmembrana nos primeiros 60 aminoácidos.

A ferramenta online OutCyte versão 1.0 (<http://www.outcyte.com>) foi utilizada para identificar proteínas que são liberadas mediante vias não

convencionais de secreção (UPS) e também para verificar a presença de hélices transmembrana. Esta ferramenta foi escolhida porque apresentou um melhor desempenho quando comparado ao conhecido SecretomeP 2.0 (Zhao et al. 2019).

A ferramenta online ExoPred (<http://imath.med.ucm.es/exopred/>) foi utilizada para identificar proteínas com potencial secreção dentro de exossomos ou vesículas extracelulares (Ras-Carmona et al. 2021). Aquelas proteínas que não tinham peptídeo sinal, UPS ou evidência de serem secretadas em exossomos ou vesículas extracelulares foram consideradas proteínas intracelulares ou não secretadas.

As ferramentas online NetNGlyc versão 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) e NetOGlyc versão 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>) foram utilizadas para predição de sítios de N-glicosilação e O-glicosilação de proteínas, respectivamente.

A densidade antigênica de cada proteína identificada foi estimada mediante sua abundância de regiões antigênicas (AAR) usando a ferramenta online Secret-AAR (<http://microbiomics.ibt.unam.mx/tools/aar/toolaar.php>). O valor de AAR é expresso como a razão entre o comprimento da sequência de aminoácidos e o número de regiões antigênicas previstas (Cornejo-Granados et al. 2019). Proteínas com um valor $AAR \leq 50$ foram consideradas potencialmente antigênicas.

3.11. Alinhamento múltiplo de sequências de proteínas

Três isoformas de arginina quinase, identificadas pela espectrometria de massas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, foram selecionadas para ser comparadas entre elas e com seus homólogos presentes de outras espécies do gênero *Strongyloides*, bem como em outros nematódeos parasitos mediante o alinhamento múltiplo de sequências utilizando o programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e visualizadas com o programa Jalview (<https://www.jalview.org/>).

A porcentagem de identidade foi calculada com o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fornecido automaticamente no programa Uniprot BLAST (<https://www.uniprot.org/blast/>). As árvores filogenéticas foram construídas no programa Jalview com as sequências das diferentes proteínas anteriormente mencionadas para representar a relação evolutiva entre as diferentes espécies.

Outras proteínas de interesse imunológico identificadas no presente estudo, tais como as proteínas de domínio CAP, enolase e as proteína 14-3-3 foram analisadas da mesma forma e comparadas com seus respectivos homólogos presentes em outras espécies.

3.12. Predição de epítomos antigênicos

A predição de epítomos antigênicos foi determinada mediante a ferramenta Secret-AAR (descrita anteriormente), a qual se baseia na informação gerada pela ferramenta de predição Bepipred 1.0 (Larsen et al. 2006) para epítomos lineares com uma longitude mínima de 6 aminoácidos (Berglund et al. 2008). As ferramentas online para predição de epítomos antigênicos BepiPred versão 2.0 (Jespersen et al. 2017)(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) e ElliPro (Ponomarenko et al. 2008) (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) também foram utilizadas, com o objetivo de validar os epítomos gerados pela ferramenta Secret-AAR.

3.13. Modelagem molecular e análise estrutural de proteínas

A modelagem molecular foi realizada a partir das sequências de cada proteína (depositadas na base de dados UniProtKB) utilizando a ferramenta online Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). No caso de proteínas com peptídeo sinal, a modelagem foi feita apenas com a sequência da proteína madura. Os modelos das proteínas foram visualizados com ajuda do programa Swiss-PdbViewer 4.0 (<https://spdbv.unil.ch/>). As estruturas tridimensionais geradas pelo programa Phyre2 foram comparadas com estruturas de proteínas homólogas de interesse, depositadas no site RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e a informação sobre a ligação proteína-proteína foi obtida no site PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>) utilizando o mesmo código PDB obtido no site RCSB Protein Data Bank.

3.14. Análise estatística

Todos os dados do presente estudo foram armazenados em um arquivo Excel e as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.0. A sensibilidade e especificidade dos produtos de E/S na detecção de anticorpos IgG

mediante o ELISA foram determinados através da Curva ROC. O teste t de Student foi utilizado para avaliar se existem diferenças significativas na detecção de anticorpos nos diferentes grupos de pacientes ou indivíduos quando testados contra os dois tipos de produtos de E/S (E/S-RPMI e E/S-PBS).

A sensibilidade e especificidade dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS pelo WB foi calculada utilizando tabelas 2 x 2 com um intervalo de confiança de 95%. O índice kappa (k) foi utilizado para comparar o grau de concordância entre os dois tipos de WB. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis* mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após manutenção *in vitro* das iL3 de *S. venezuelensis* a 37°C por 24 horas, a viabilidade observada nas larvas mantidas em meio RPMI foi de 95%, enquanto que as larvas mantidas em PBS tiveram uma viabilidade entre 80 e 85%. A concentração proteica final dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, após concentração pelo sistema Amicon® de todos os sobrenadantes coletados, foi 1.018 µg/mL e 1.530 µg/mL, respectivamente.

A coloração com nitrato de prata da SDS-PAGE permitiu evidenciar a presença de 20 e 21 bandas proteicas na faixa de 10 a 348 kDa, nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS (10 µg/poço), respectivamente, com uma coincidência de 16 bandas proteicas entre os dois tipos de produtos de E/S (Tabela 1). A coloração com nitrato de prata também permitiu evidenciar uma maior intensidade em certas bandas proteicas dos produtos E/S-RPMI com PMs menores a 60 kDa (Figura 3).

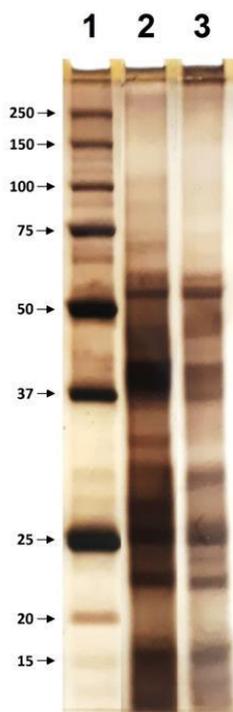


Figura 3. Eletroforese em gel poliacrilamida 12% e coloração com nitrato de prata dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis* (10 µg) obtidos após manutenção *in vitro* a 37°C por 48 horas, em meio de cultura RPMI 1640 (2) ou em tampão fosfato salino (3). Como controle, observa-se o padrão de PM à esquerda (1).

Tabela 1
 Separação dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*
 mediante eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

N° Banda	Produtos de E/S*	
	<i>S. venezuelensis</i> iL3 (kDa)	
	E/S-RPMI	E/S-PBS
1	348	348
2	-	144
3	123	-
4	88	-
5	63	63
6	54,8	54,8
7	51,3	51,3
8	-	49
9	43	43
10	41	41
11	-	39,8
12	37,5	37,5
13	35	35
14	31	-
15	-	30,4
16	27,3	-
17	-	26,6
18	25	25
19	24	24
20	21	21
21	18	18
22	16	16
23	14	14
24	13	13
25	10	10

4.2. Zimografia dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis*

A zimografia permitiu demonstrar a presença de nove bandas com atividade protease em ambos os tipos de E/S, com PM aproximados de 29,7; 32,3; 36,6; 41; 47; 53,5; 57,6; 72,3 e 102,6 kDa. A análise dos produtos de E/S em presença de diferentes tipos de inibidores de proteases demonstrou a presença de serinoproteases (bandas de 29,7; 32,3; 36,6; 47 e 57,6 kDa) e metaloproteases (29,7, 41, 53,5 e 102,6 kDa). O tratamento prévio dos produtos de E/S com uma mistura de todos os

inibidores anteriormente mencionados, permitiu observar ainda uma banda com atividade protease de 41 kDa, sendo provavelmente uma aspartil protease (Figura 4).

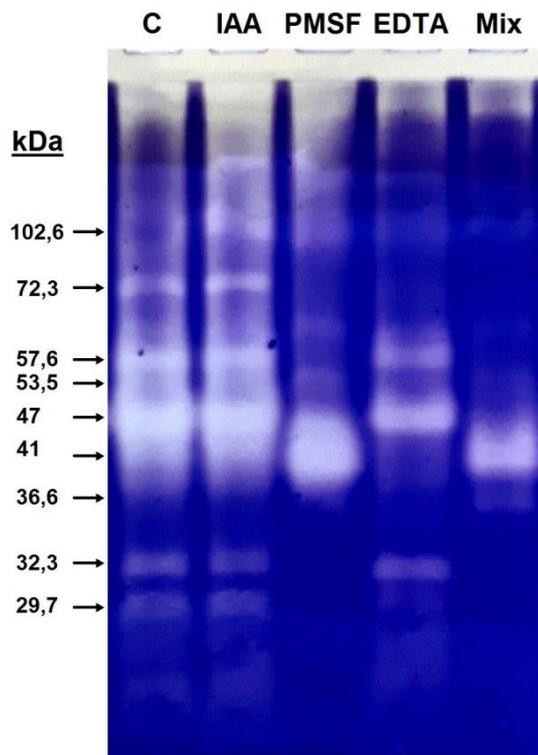


Figura 4. Atividade protease dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* obtidos após manutenção *in vitro* a 37°C por 48 horas em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2)(C) e em presença de inibidor de cisteinoproteases (IAA), serinoproteases (PMSF), e metaloproteases (EDTA) à concentração final de 0.01M. Adicionalmente, os produtos de E/S também foram incubados com uma mistura dos inibidores mencionados (MIX), mostrando ainda a presença de uma banda com atividade protease.

4.3. Detecção de anticorpos IgG por ELISA

Houve diferenças estatisticamente significativas nas absorvâncias geradas por ambos os tipos de produtos de E/S, com leituras algo mais elevadas quando os soros de pacientes com estrogiloidíase (Student t-test = 5,856; $p < 0,0001$) e pacientes com outras helmintíases (Student t-test = 5,039; $p < 0,0001$) foram testados contra os produtos E/S-RPMI. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa (Student t-test = 0,7378; $p = 0,4623$) nas absorvâncias geradas quando os soros de indivíduos saudáveis foram testados contra ambos os tipos de produtos de E/S.

A curva ROC gerada com as absorvâncias dos soros de pacientes com estrogiloidíase e soros de indivíduos saudáveis teve uma área de 1,000 (IC 99% =

1,000-1,000; $p < 0,0001$) para ambos os tipos de produtos de E/S. No entanto, diferentes valores de *cut-off* foram obtidos para os produtos E/S-RPMI (*cut-off* = 0,350) quanto para os produtos E/S-PBS (*cut-off* = 0,300).

Todos os soros de pacientes com estrogiloidíase reagiram contra ambos os tipos produtos de E/S com valores de absorbância superiores ao valor do *cut-off* (sensibilidade de 100%). Da mesma forma, todos os soros de indivíduos saudáveis tiveram escassa reatividade contra ambos os tipos produtos de E/S, com valores de absorbância inferiores ao valor do *cut-off* (especificidade de 100%). No entanto, quatro amostras de soro de pacientes com outras helmintíases (três pacientes com ascaridíase e um paciente com trichuriase) reagiram com ambos os produtos de E/S, com valores de absorbância superiores ao respectivo *cut-off*, obtendo-se uma reatividade cruzada de 4,76% (Tabela 2 e Figura 5).

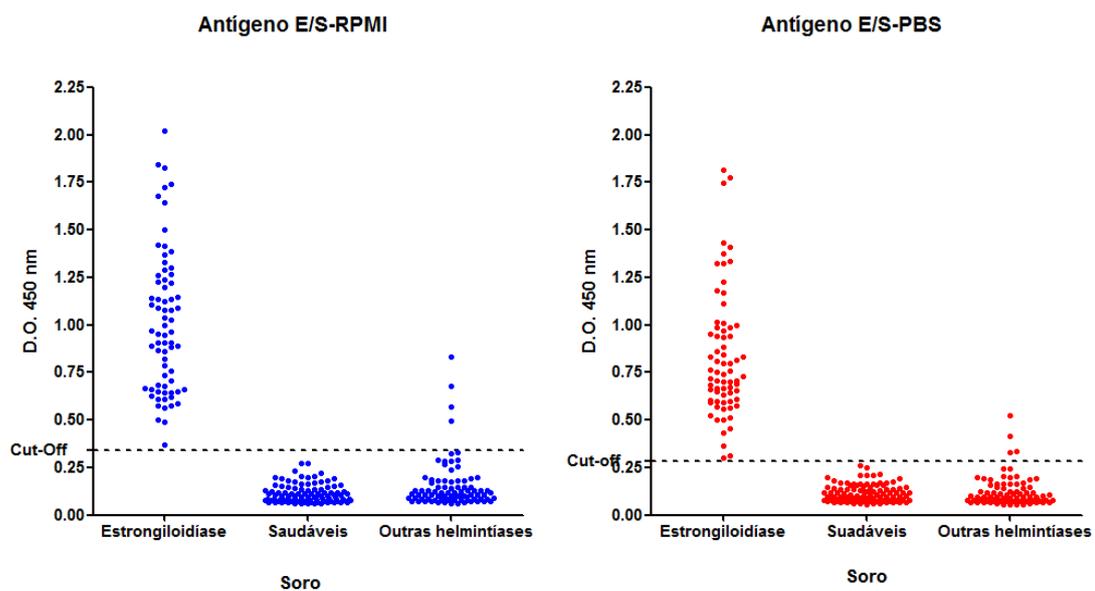


Figura 5. Reatividade dos soros de pacientes com estrogiloidíase, com outras helmintíases e indivíduos saudáveis contra os produtos E/S-RPMI (esquerda) e E/S-PBS (direita) testados pelo teste de ELISA para anticorpos IgG. Ambos gráficos mostram o valor *cut-off* para os produtos E/S-RPMI (0,35) e para os produtos E/S-PBS (0,30).

Tabela 2

Reatividade das amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, indivíduos saudáveis e pacientes com outras helmintíases contra os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis*, determinados pelo teste ELISA-IgG

Amostras de Soro	E/S-RPMI Positividade	E/S-PBS Positividade
Estrongiloidíase (n = 71)	71	71
Saudáveis (n = 105)	0	0
Ascaridíase (n = 17)	3	3
Ancilostomíase (n = 7)	0	0
Enterobíase (n = 2)	0	0
Trichuríase (n = 20)	1	1
Teníase (n = 1)	0	0
Cisticercose (n = 11)	0	0
Himenolepiíase (n = 13)	0	0
Difilobotríase (n = 5)	0	0
Fasciolose (n = 6)	0	0
Esquistossomose (n = 2)	0	0

4.4. Detecção de anticorpos IgG por *Western-blotting*

Dezesseis bandas antigênicas foram reconhecidas nos produtos E/S-RPMI pelo soro de controle positivo e pelos soros dos pacientes com estrogiloidíase, as quais foram logo agrupadas em bandas de baixo peso molecular (LMW: 30, 32, 36, 39, 41, 45, 47), de peso molecular intermediário bandas (IMW: 55, 60, 66, 71, 89) e bandas de alto peso molecular (HMW: 94, 105-115, 179, 224 kDa) (Figura 6).

Com exceção da banda antigênica de 179 kDa, todas as mesmas bandas foram reconhecidas nos produtos E/S-PBS pelo soro de controle positivo e pelos soros dos pacientes com estrogiloidíase, embora houve uma reatividade mais fraca em algumas bandas antigênicas do grupo LMW (30, 41, 45 e 47 kDa) (Tabela 3 e Figura 6). Por tanto, a sensibilidade para ambos os tipos de produtos de E/S foi de 100%.

Houve uma reatividade predominante com as bandas de 47 kDa (97,2%), 36 kDa (92,9%), 224 kDa (83,1%), 55 kDa (80,3%), 60 kDa e 179 kDa (76,1%), 41 kDa e 105-115 kDa (73,2%). Por outro lado, soros de indivíduos saudáveis reconheceram predominantemente as bandas de 60 kDa (72,4%) e 55 kDa (18,1%) (Tabela 4).

Tabela 3

Bandas antigénicas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis* detectadas por anticorpos IgG do soro controle (+) mediante *Western-blotting*.

Nº Banda	Produtos de E/S*	
	<i>S. venezuelensis</i> iL3 (kDa)	
	E/S-RPMI	E/S-PBS
1	224	224
2	179	-
3	105-115	105-115
4	94	94
5	89	89
6	71	71
7	66	66
8	60	60
9	55	55
10	47	47
11	45	45
12	41	41
13	39	39
14	36	36
15	32	32
16	30	30

Os soros de pacientes com outras helmintíases reconheceram bandas de 60 kDa (42,9%), 55 kDa (33,3%) e 66 kDa (21,4%), seguidas por bandas de 47 kDa e 105-115 kDa (11,9%) e a banda de 224 kDa (10,7%). Houve um reconhecimento inesperado de duas bandas de 15 kDa (8,3%) e 136 kDa (4,8%) em ambos os tipos de produtos E/S que não foram reconhecidos pelos soros de pacientes com estrongiloidíase e nem pelos soros de indivíduos saudáveis. Cabe ressaltar que as bandas de 36 kDa, 71 kDa e 94 kDa não foram reconhecidas pelas amostras de pacientes com outras helmintíases (Tabela 4).

Os pacientes infectados com *A. lumbricoides* reconheceram as bandas de 55 kDa (76,5%), 60 kDa (64,7%) e 66 kDa (52,9%); os pacientes infectados com *T. trichiura* reconheceram as bandas de 60 kDa (35%) e uma banda inesperada de 136 kDa (20%); os pacientes infectados com *E. vermicularis* reconheceram a banda de 60 kDa (50%); os pacientes infectados com ancilostomídeos reconheceram a banda de 60 kDa (28,6%), seguido pelas bandas de 55 kDa e 224 kDa (14,3%) (Tabela 5).

Os pacientes infectados com *H. nana* reconheceram as bandas de 32, 39, 55 e 60 kDa (30,8%), 41 kDa e 45 kDa (15,4%) e 30 kDa (7,7%); os pacientes com neurocisticercose reconheceram as bandas de 55 kDa e 66 kDa (54,5%), seguido pelas bandas de 89 kDa, 105-115 kDa e 179 kDa (45,5%). Uma banda inesperada de 15 kDa também foi reconhecida por 54,5% desses pacientes, bem como pelo único paciente infectado com *T. solium*. Os pacientes infectados com *D. pacificum* reconheceram predominantemente a banda de 60 kDa (80%), seguido pelas bandas de 66 kDa e 89 kDa (60%) (Tabela 5).

Todos os pacientes infectados com *S. mansoni* reconheceram as bandas de 60 e 224 kDa e metade deles reconheceram as bandas de 47 e 55 kDa. Todos os pacientes infectados com *F. hepatica* reconheceram a banda de 224 kDa e metade deles reconheceram as bandas de 32, 60 e a banda de 105-115 kDa (Tabela 5 e Figura 7).

Uma perfeita concordância foi observada em ambos os tipos de produtos E/S, em relação à detecção de anticorpos IgG nos três grupos de soros (índice kappa = 1). Com base nos resultados de WB, três frações antigênicas de ambos os tipos de produtos E/S foram escolhidas para serem analisadas por espectrometria de massa: fração LMW (de 30 a 47 kDa), fração IMW (de 55 a 89 kDa) e fração HMW (de 94 a 224 kDa).

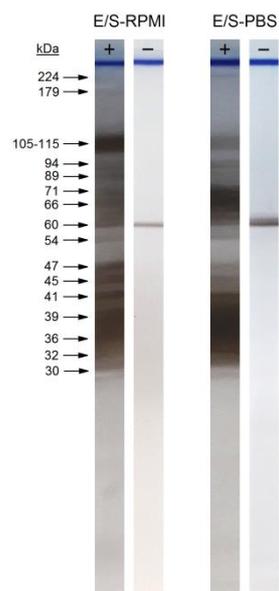


Figura 6. Bandas antigênicas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS detectadas por anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda) e soro controle negativo (direita) mediante a técnica de *Western-blotting*.

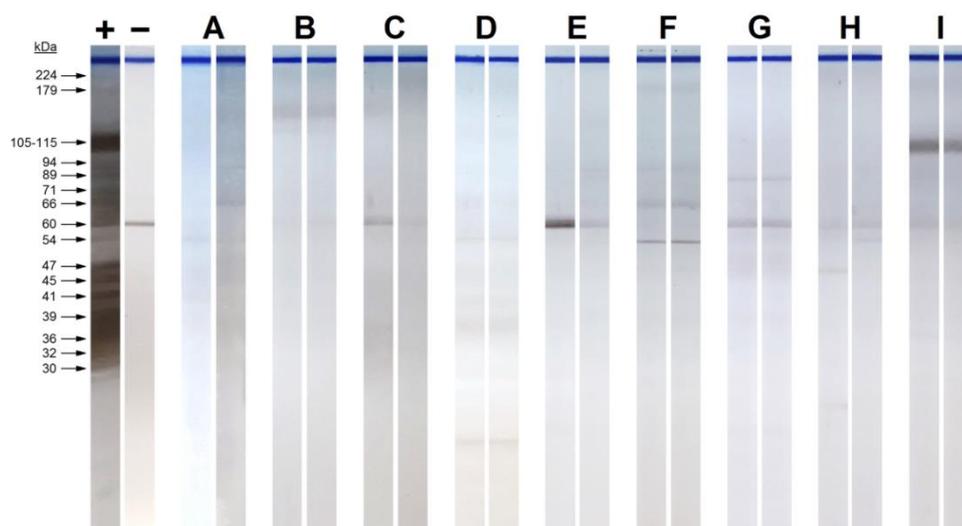


Figura 7. Reatividade dos anticorpos IgG contra os produtos E/S-RPMI mediante o teste de *Western-blotting* num painel representativo de soros de pacientes com estrogiloidíase (+), indivíduos saudáveis (-) e pacientes com outras helmintíases: ascaridíase (A), trichuríase (B), enterobíase (C); ancilostomíase (D), himenolepíase (E), neurocisticercose (F), difilobotríase (G), esquistossomose (H) e fasciolose (I).

Tabela 4

Distribuição da reatividade das bandas antigénicas dos produtos E/S-RPMI nas amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, indivíduos saudáveis e pacientes com outras helmintíases, detectadas pelo *Western-blotting*

Banda Antigénica (kDa)	% Positividade		
	Pacientes estrogiloidíase	Indivíduos saudáveis	Outras helmintíases
224	83,93	0	10
179	75	0	25
105-115	73,21	0	31,67
94	64,29	1,82	0
89	41,07	0	28,33
71	35,71	1,82	0
66	41,07	0	41,07
60	75	72,73	58,33
55	80,36	18,18	58,33
47	96,43	3,64	28,33
45	46,43	1,82	21,67
41	73,21	3,64	10
39	44,64	0	18,33
36	92,95	0	0
32	26,79	0	13,33
30	33,93	0	3,33

Tabela 5
Bandas antigênicas dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* que foram reconhecidas por soros de pacientes com outras helmintíases

Soros de pacientes infectados com outros helmintos (n = 84)	Bandas antigênicas (kDa) dos produtos de E/S																	
	15*	30	32	36	39	41	45	47	55	60	66	71	89	94	105-115	136*	179a	224
<i>Ascaris lumbricoides</i> (n = 17)						4	4	6	13	11	9							
<i>Trichuris trichiura</i> (n = 20)									3	7					2	4		
<i>Enterobius vermicularis</i> (n = 2)										1								
Hookworms (n = 7)									1	2								1
<i>Hymenolepis nana</i> (n = 13)		1	4		4	2	2	3	4	4								
<i>Taenia solium</i> (n = 1)	1																	
Neurocysticercosis (n = 11)	6								6	2	6		5		5		5	
<i>Diphyllobothrium pacificum</i> (n = 5)										4	3		3					
<i>Schistosoma mansoni</i> (n = 2)								1	1	2								2
<i>Fasciola hepática</i> (n = 6)			3							3					3			6

*Bandas antigênicas inesperadas. ^aComo a banda antigênica de 179 kDa esteve ausente nos produtos E/S-PBS, não houve reatividade neste grupo de soros.

4.5. Eletroforese e *Western-blotting* bidimensional

A coloração com nitrato de prata evidenciou uma distribuição de *spots* com um pI entre 4 e 10, bem como uma maior concentração de *spots* com PM iguais ou menores a 50 kDa. Embora as diferenças entre o número de *spots* de ambos os tipos de produtos de E/S seja mínima, a eletroforese bidimensional também mostrou que os produtos E/S-RPMI diferenciaram-se pela presença de *spots* alcalinos entre 30 e 37 kDa e quatro *spots* de pI neutro e PM maior a 250 kDa (figura 8A), enquanto que os produtos E/S-PBS diferenciaram-se com a presença de vários *spots* de pI alcalino

de 25 e 75 kDa. Ademais, também houve uma maior intensidade na coloração de *spots* com PM iguais ou inferiores a 20 kDa (Figura 8B).

O soro controle positivo reconheceu um total de 41 e 31 *spots* nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, respectivamente, com PMs iguais ou maiores que 30 kDa e com um pI 4 a 10. Houve uma coincidência de 27 *spots* em ambos os tipos de E/S.

Os *spots* antigênicos dos produtos E/S-RPMI diferenciaram-se dos produtos E/S-PBS principalmente pela presença de 17 *spots* na faixa de 30 e 47 kDa (spot N° 20 a 27 e spot N° 33 a 41), bem como quatro *spots* alcalinos entre 60 e 100 kDa (spot N° 29 ao 32) (Figura 9). Por outro lado, os produtos E/S-PBS apresentaram um menor número de *spots* na faixa de 30 e 47 kDa (8 *spots*), dois *spots* alcalinos entre 60 e 100 kDa (spot N° 29 e 30) e tiveram quatro *spots* (N° 9a, 10a, 18a e 42a) que não estiveram presentes nos produtos E/S-RPMI (Figura 10).

O soro controle negativo identificou 13 *spots* em ambos os tipos de produtos E/S (spot N° 2, 3, 5, 6, 8, 11, 16, 16a, 16b, 18, 19a, 20 e 36), dos quais dez *spots* coincidiram com os *spots* identificados pelo soro controle positivo (Figura 11).

O *pool* de soros de pacientes infectados com nematódeos identificou um total de nove *spots* (spot N° 2, 8, 9, 10, 16, 18, 19, 20 e 22), dos quais cinco *spots* coincidiram com os *spots* identificados pelo soro controle negativo (Figura 12).

O *pool* de soros de pacientes infectados com cestódeos identificou um total de seis *spots* (spot N° 8, 16, 18, 19, 20 e 21), dos quais quatro *spots* coincidiram com os *spots* identificados pelo soro controle negativo (Figura 13).

O *pool* de soros de pacientes infectados com trematódeos identificou um total de nove *spots* (spot N° 4, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 e 17), dos quais três *spots* coincidiram com os *spots* identificados pelo soro controle negativo (Figura 14).

Os *spots* N° 8 e 16 (cujo PM calculado é 136 e 60 kDa, respectivamente) foram identificados pelo soro controle negativo e o *pool* de soros de pacientes com outras helmintíases e foram considerados 100% inespecíficos. Todos esses resultados também foram observados quando os produtos E/S-PBS foram enfrentados contra o soro controle negativo ou o *pool* de soros de pacientes infectados com outras helmintíases.

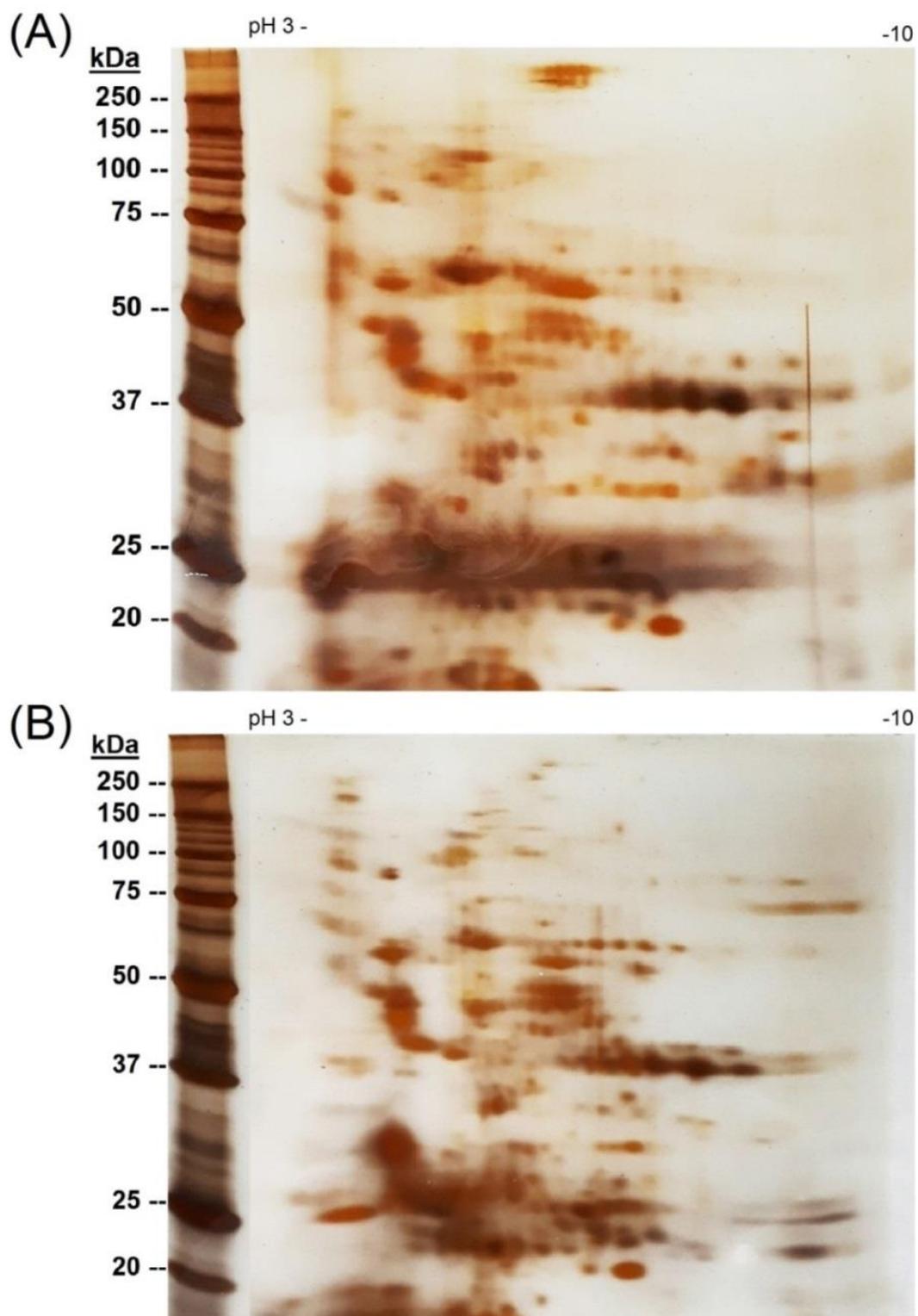


Figura 8. Eletroforese bidimensional dos produtos de E/S de larvas de *S. venezuelensis* mantidas em meio RPMI-1640 (A) e em tampão fosfato salino (B) corados com nitrato de prata. Como controle, o marcador de PM é mostrado à esquerda de cada gel.

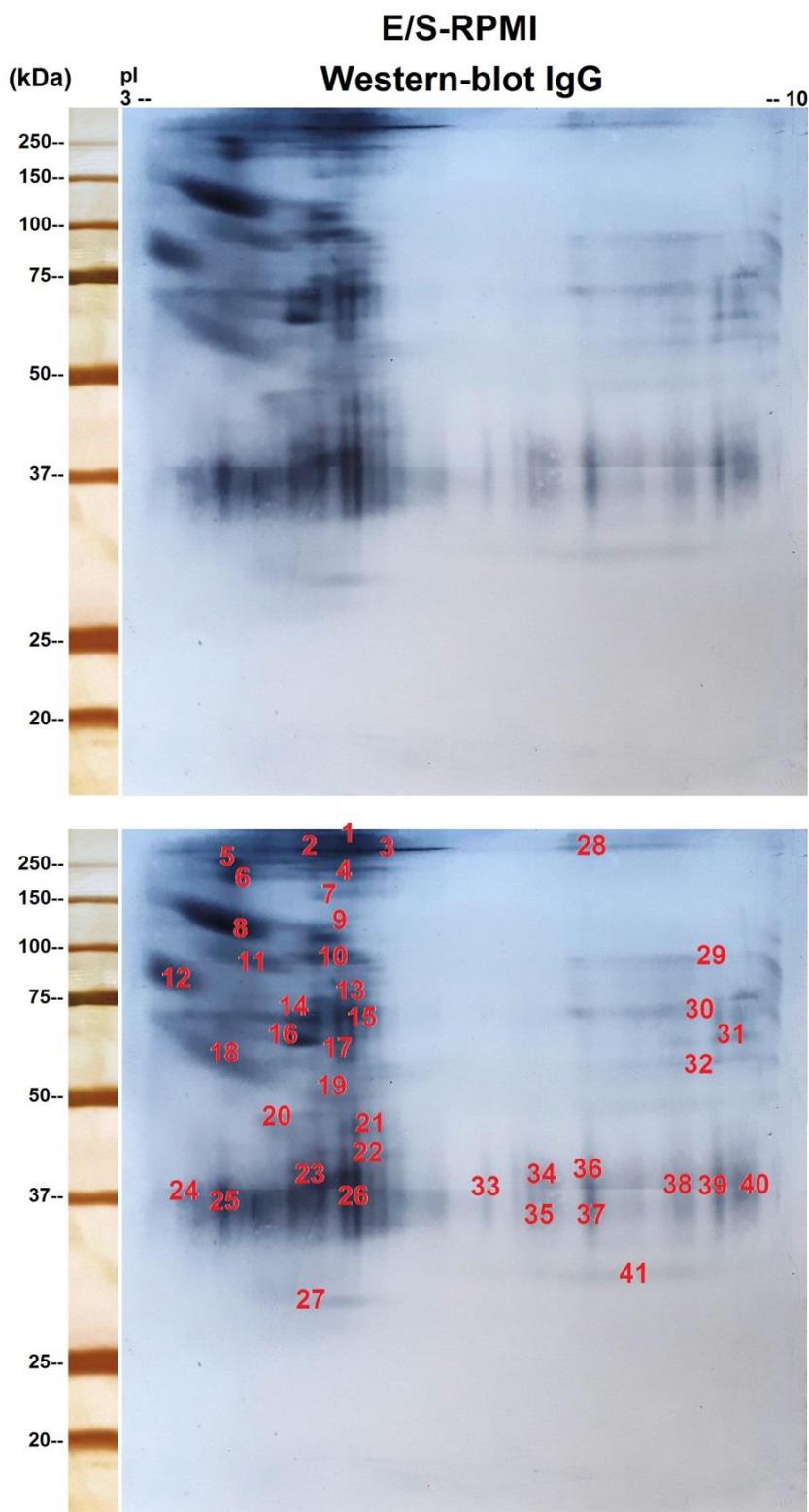


Figura 9. Reatividade de anticorpos IgG do soro controle positivo (*pool* de soros de pacientes com *estrongiloidíase*) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI), separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 41 *spots* antigênicos, marcados em cor vermelha (imagem inferior).

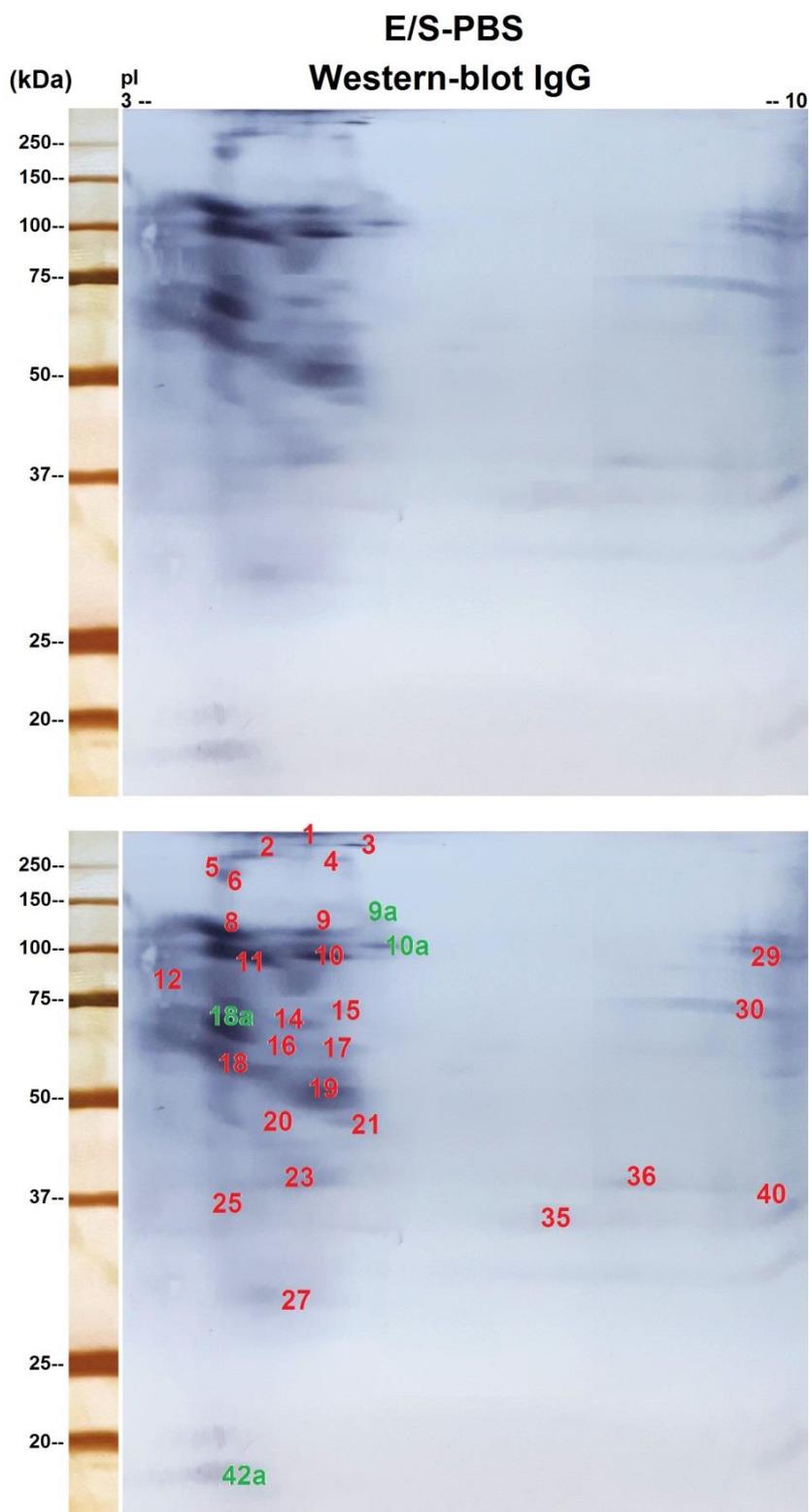


Figura 10. Reatividade de anticorpos IgG do soro controle positivo (*pool* de soros de pacientes com estrogiloidíase) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em tampão fosfato salino (E/S-PBS), separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 31 *spots* antigênicos (imagem inferior). Os *spots* descritos em cor verde correspondem a novos *spots*.

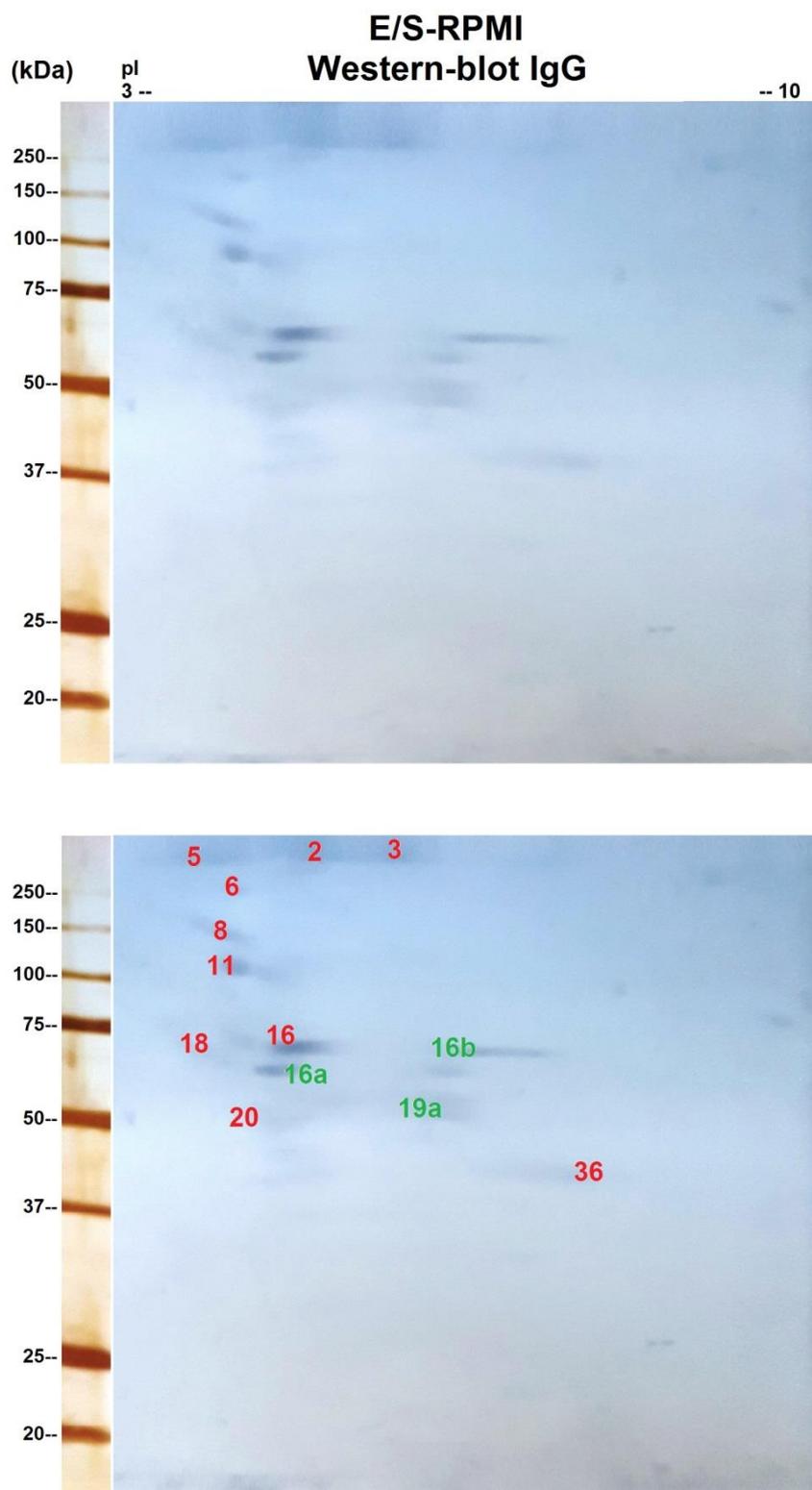


Figura 11. Reatividade de anticorpos IgG do soro controle negativo (*pool* de soros de indivíduos saudáveis) contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 13 *spots* antigênicos (imagem inferior). Os *spots* descritos em cor verde correspondem a novos *spots*.

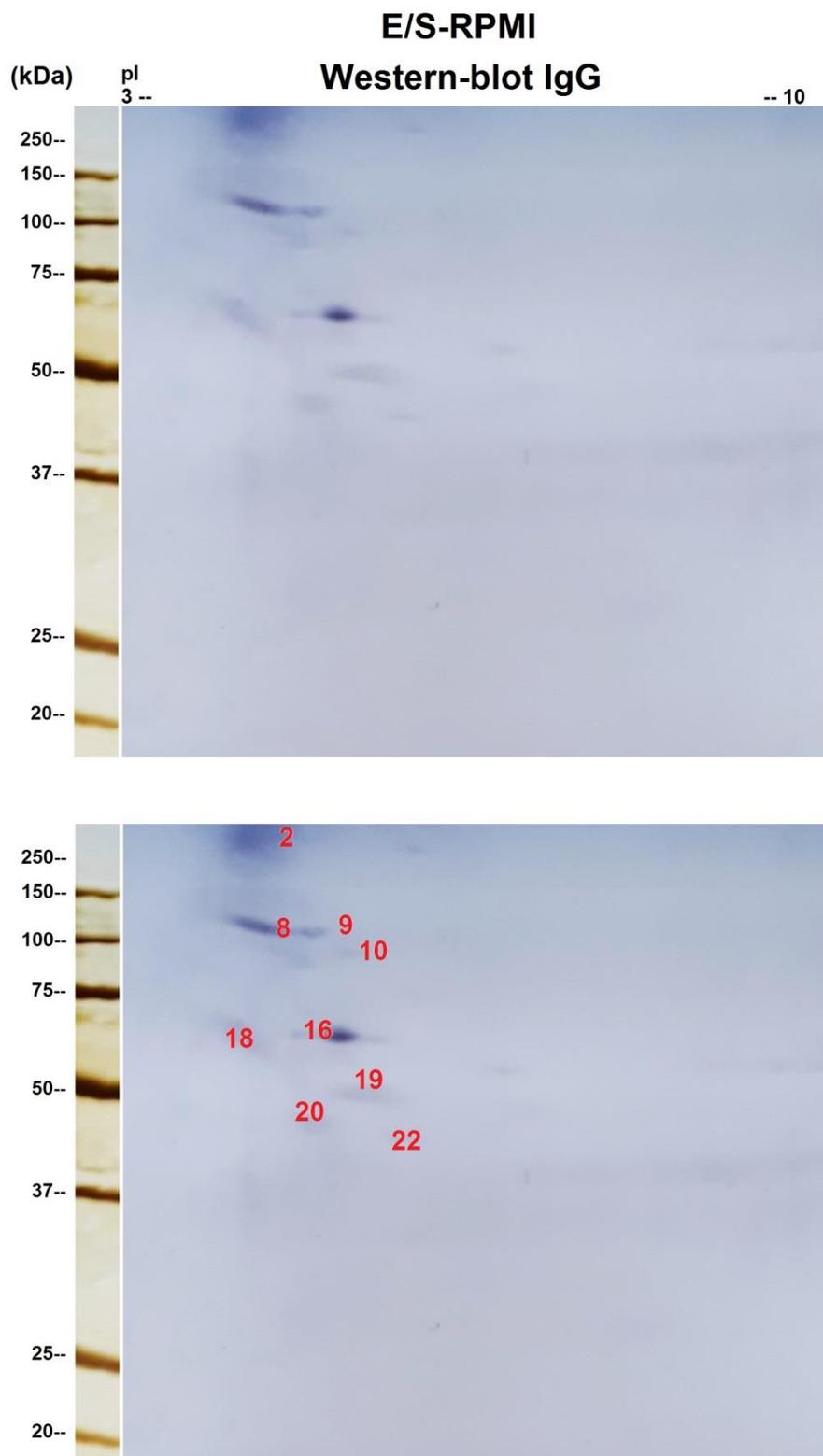


Figura 12. Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com nematódeos contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 9 *spots* antigênicos (imagem inferior).

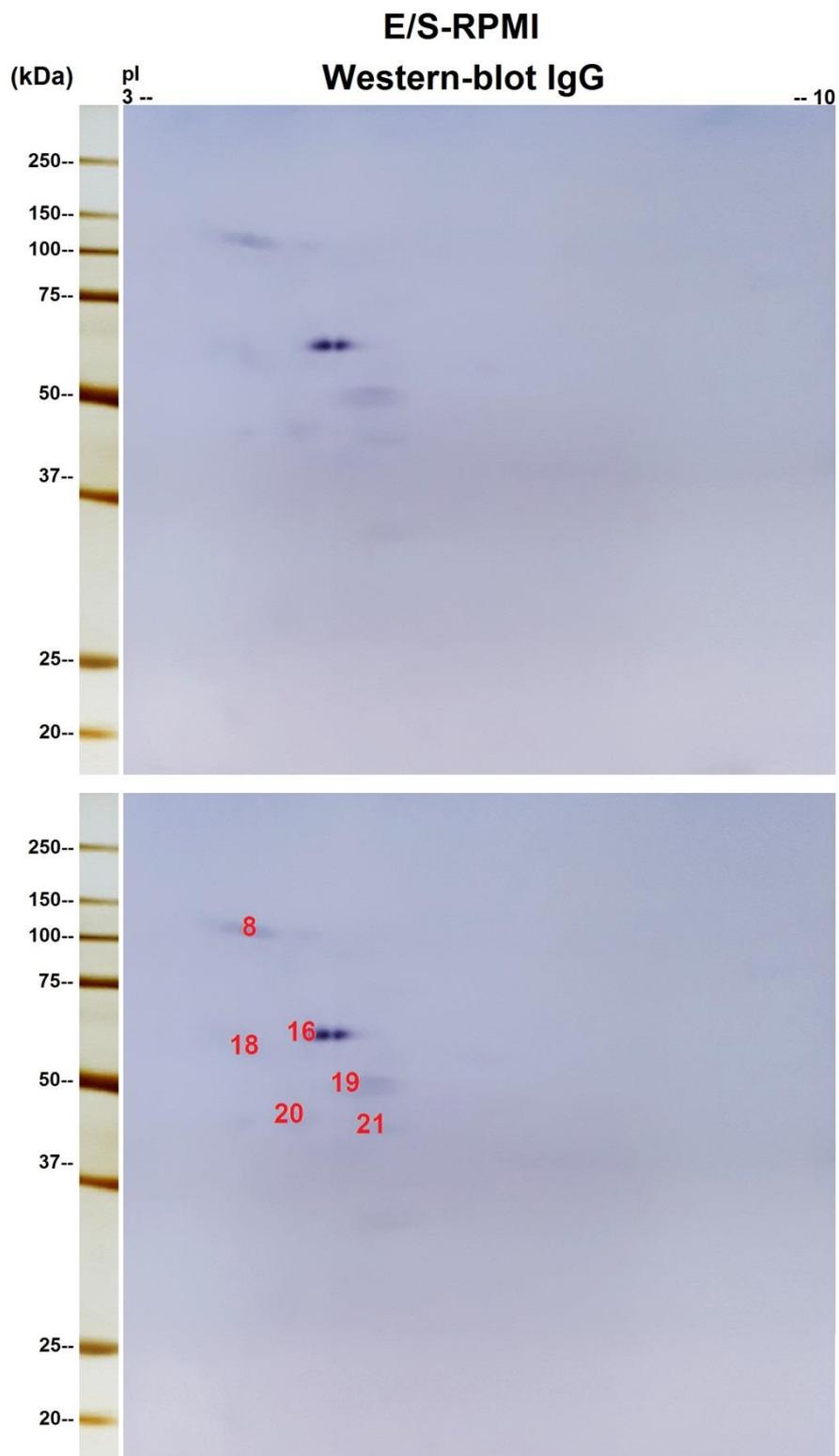


Figura 13. Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com cestoides contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 6 *spots* antigênicos (imagem inferior).

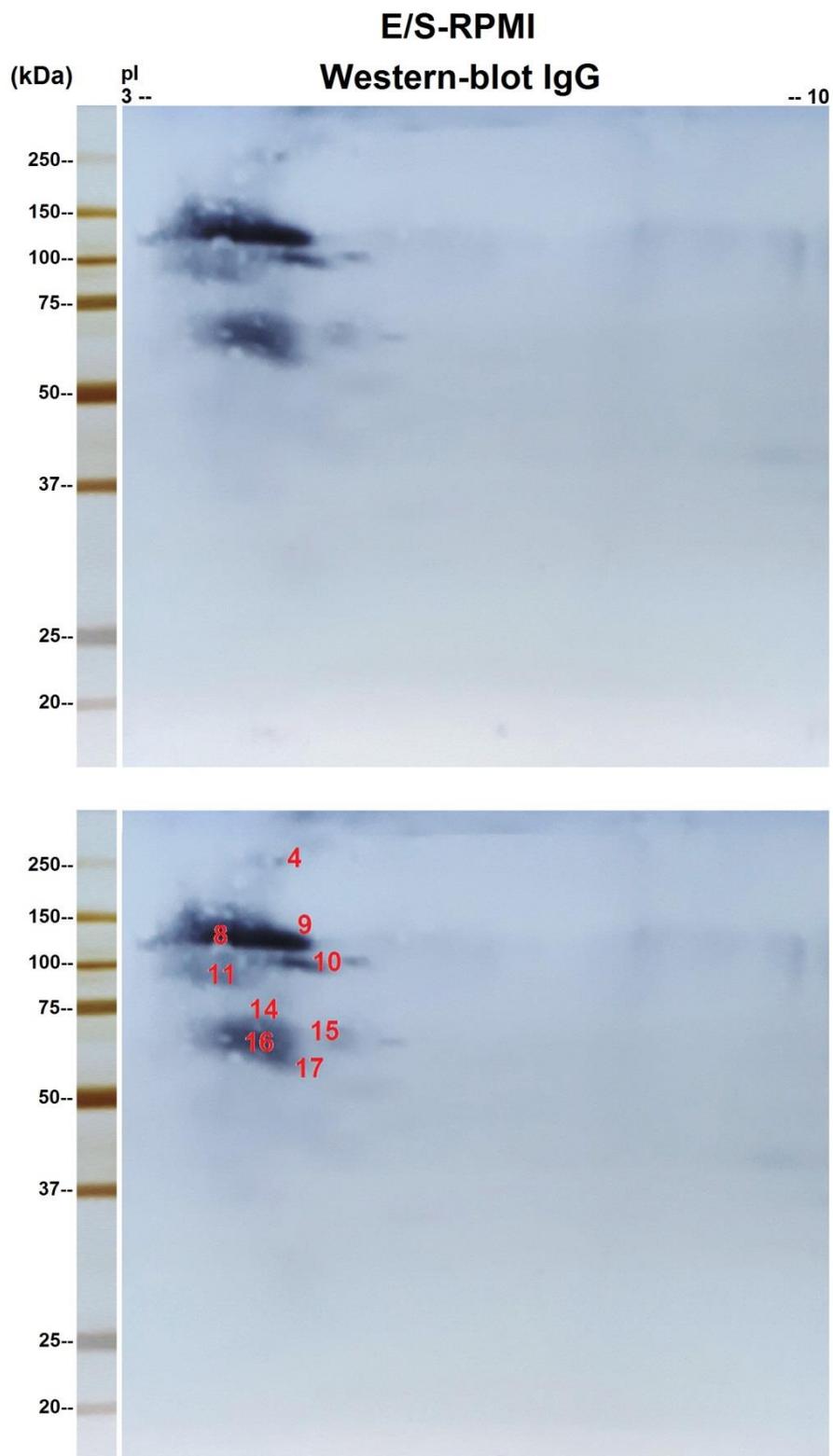


Figura 14. Reatividade de anticorpos IgG do *pool* de soros de indivíduos infectados com trematódeos contra os produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* coletados em meio RPMI-1640 (E/S-RPMI) que foram separados através de eletroforese bidimensional em gradiente de pH 3 a 10 e logo testados mediante a técnica de *Western-blotting* (imagem superior), o qual identificou um total de 9 *spots* antigênicos (imagem inferior).

4.6. Análise proteômica dos produtos de E/S de larvas infectantes de *S. venezuelensis*

4.6.1. Análise dos produtos E/S-RPMI por espectrometria de massas e bioinformática

A espectrometria de massas identificou um total de 71 proteínas nos produtos E/S-RPMI com PMs que variaram entre 7,7 kDa e 589,5 kDa e com um pI entre 4,8 a 10,3 (Anexos: Tabela suplementar 1). Dezesesseis proteínas (22,5%) tiveram peptídeo sinal para ser liberadas através via secretora clássica, 40 proteínas (56,3%) tiveram predição para ser liberadas dentro vesículas extracelulares ou exossomos e 15 proteínas (21,1%) foram consideradas como intracelulares ou não secretadas. De todas as proteínas identificadas nos produtos E/S-RPMI, 14 proteínas (19,7%) tiveram entre 1 a 10 domínios transmembrana.

Por outro lado, a ferramenta OutCyte 1.0 também identificou 16 proteínas com peptídeo sinal, 21 proteínas (29,6%) tiveram evidencia de ser secretadas pela via não convencional, 28 proteínas (39,4%) foram consideradas como intracelulares e apenas seis proteínas tiveram domínios transmembrana.

Em relação ao tipo de glicosilação, 10 proteínas (14,1%) tiveram entre 1 a 5 sítios de N-glicosilação, 52 proteínas (73,2%) tiveram entre 1 a 366 sítios de O-glicosilação e sete proteínas (9,9%) tiveram sítios para ambos os tipos de glicosilação (Anexos: Tabela suplementar 1).

Em relação à sua provável localização como componente celular, 47,9% das proteínas identificadas foram relacionadas ao citoplasma, 21,1% relacionadas à região extracelular, 9,9% relacionadas à membrana celular, 9,9% relacionadas ao núcleo, 5,6% relacionadas à mitocôndria, 2,8% relacionadas ao retículo endoplasmático, 1,4% relacionadas ao aparato de Golgi e 1,4% relacionadas ao lisossomo (Anexos: Tabela suplementar 3).

Em termos de processo biológico, as proteínas identificadas estiveram envolvidas principalmente no metabolismo de carboidratos (9,9%), desenvolvimento larval (8,5%), sinalização celular (7%), processos envolvendo DNA (4,2%), processos envolvendo RNA (4,2%), processos envolvendo fosforilação (4,2%), proteólise (2,8%), processos biossintéticos (2,8%), processos catabólicos (2,8%), estresse oxidativo (1%), entre outros (Anexos: Tabela suplementar 3).

Em termos de função molecular, as proteínas identificadas estiveram envolvidas principalmente na ligação de ATP (21,1%), ligação de íons metálicos (19,7%), ligação de proteínas (11,3%), atividade transferase (9,9%), atividade quinase (8,5%), atividade peptidase (7%), ligação de ácidos nucleicos (4,2%), entre outros (Anexos: Tabela suplementar 3).

Entre as proteínas que tiveram maior cobertura de identificação, podemos citar as seguintes: três CAP domain-containing protein de 21,4 kDa (53% de cobertura), 19,8 kDa (51% de cobertura) e 20,3 kDa (50% de cobertura); duas isoformas da 14-3-3 protein zeta de 27,9 kDa (28% de cobertura) e 33,7 kDa (26% de cobertura); malate dehydrogenase (PM = 40,9 kDa; 26% de cobertura); 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase ou enolase (PM = 47,2 kDa; 24% de cobertura); fructose-bisphosphate aldolase (PM = 39,5 kDa; 22% de cobertura) e duas isoformas de actin, alpha cardiac muscle de 40,8 kDa e 40,7 kDa (ambas com 20% de cobertura).

4.6.2. Espectrometria de massas e análise bioinformática das frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI

Um total de 44 proteínas foram identificadas nas três frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI, das quais 8 proteínas (18,2%) tinham peptídeo sinal para ser liberadas através da via secretora clássica, 24 proteínas (54,5%) tinham evidência de ser liberadas dentro vesículas extracelulares ou exossomos e 12 proteínas (27,3%) foram consideradas intracelulares.

Vinte e oito proteínas (63,6%) tiveram sítios para O-glicosilação (12 proteínas na fração HMW, 6 proteínas na fração IMW e 10 proteínas na fração LMW); 6 proteínas (13,6%) tiveram sítios para N-glicosilação (5 proteínas na fração HMW e 1 proteína na fração LMW) e 4 proteínas tiveram sítios com ambos os tipos de glicosilação (3 proteínas na fração HMW e 1 proteína na fração LMW).

A ferramenta Secret-AAR classificou 28 proteínas (63,6%) como potencialmente antigênicas com valores AAR entre 24,6 e 49,25 (Tabela 6).

Em relação ao componente celular, essas proteínas estiveram relacionadas principalmente ao citoplasma (38,6%), à membrana celular (22,7%), à região extracelular (13,6%) e ao núcleo (9,1%). Em termos de processo biológico, essas proteínas estiveram envolvidas principalmente no transporte de proteínas (11,4%),

desenvolvimento larval (9,1%), processo biossintético (9,1%), estresse oxidativo (9,1%) e processo metabólico de carboidratos (6,8%), entre outros. Em termos de função molecular, essas proteínas estiveram envolvidas principalmente na ligação de íons metálicos (22,7%), ligação de ATP (18,2%), ligação de proteínas (13,6%), ligação de ácidos nucleicos (11,4%), atividade transferase (11,4%), atividade quinase (9,1%) e atividade peptidase (9,1%), entre outros.

Na fração HMW, 16 proteínas foram identificadas por espectrometria de massa (5 proteínas com peptídeo sinal, 7 proteínas secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 4 proteínas consideradas intracelulares) e 10 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre as proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados de WB, observa-se a degenerin unc-8 (94,56 kDa; pI = 6,05), dois peroxidase-like proteins de 107,66 kDa (pI = 7,04) e 114,6 kDa (pI = 9,64), calsynenin-1 (111,15 kDa; pI = 4,99), e duas proteínas não caracterizadas de 169,075 kDa (pI = 6,47) e 220,3 kDa (pI = 5,03).

Na fração IMW, nove proteínas foram identificadas (6 proteínas foram secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 3 proteínas foram intracelulares) e 6 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre as proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados de WB, observa-se a actin, alpha cardiac muscle 1 (55,68 kDa; pI = 6), phosphoglycerate mutase (57,56 kDa; pI = 5,89), glucose-6-phosphate isomerase (62,19 kDa; pI = 6,52), phosphoenolpyruvate carboxykinase (73,94 kDa; pI = 6,03), e calpain-2 catalytic subunit (89,93 kDa; pI = 4,87).

Na fração LMW, 19 proteínas foram identificadas (2 proteínas com peptídeo sinal, 11 proteínas secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 6 consideradas intracelulares) e 12 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre essas proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados de WB observa-se duas CAP domain-containing protein de 30,5 kDa (pI = 9,79) e 40,67 kDa (pI = 10,33), 14-3-3 protein zeta (33,74 kDa; pI = 4,81), arginine kinase (37,04 kDa; pI = 7,57), adenylate kinase isoenzyme 1 (38,7 kDa; pI = 7,51), fructose-bisphosphate aldolase (39,49 kDa; pI = 6,32), malate

dehydrogenase (40,96; pI = 8,91), dois isoformas de actin, alpha cardiac muscle 1 of 41,79 kDa e 41,8 kDa (pI = 5,3), uma proteína não caracterizada 44,3 kDa (pI of 7,43), isocitrate dehydrogenase (46,015 kDa; pI = 6,04) e 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase ou enolase (47,17 kDa; pI = 6,04).

O diagrama de dispersão feito entre o pI (x) e o PM (y) de todas as proteínas com potencial antigênico das três frações antigênicas (HMW, IMW e LMW) mostrou uma similitude com os resultados obtidos na reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo contra os produtos E/S-RPMI mediante WB bidimensional, mostrando que a ferramenta bioinformática Secret-AAR pode ser útil para qualificar quais proteínas possuem um potencial antigênico (Figura 13).

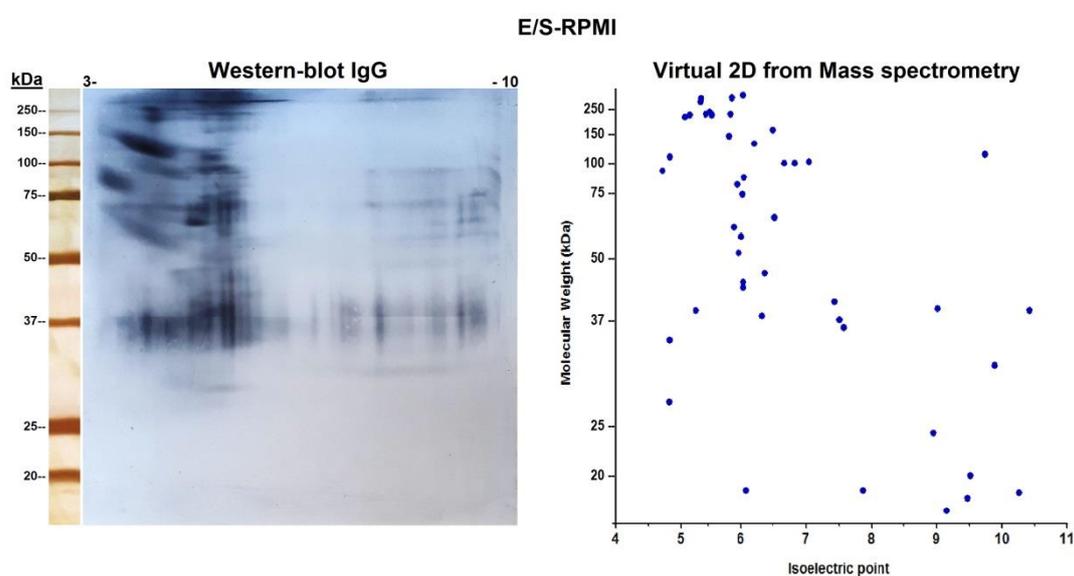


Figura 15. Gráfico de dispersão (ponto isoelétrico = x; peso molecular em kDa = y) das proteínas identificadas nas três frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI (direita) e sua similaridade com os resultados obtidos no WB bidimensional para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda).

Tabela 6
 Identificação de proteínas nas três frações antigênicas (LMW, IMW e HMW)
 dos produtos E/S-RPMI de iL3 de *S. venezuelensis* por espectrometria de massas

Nº	Uniprot accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Uniq	pI	PM	Description	SignalP	Outcyte	ExoPred	TMHMM 2.0	N-Glyc	O-Glyc	Fraction	AAR value
1	A0A0K0F3W6	21.22	1	2	2	5.03	220.295	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	13	HMW	47.44
2	A0A0K0FPQ6	33.03	1	2	2	5.9	186.761	DNA polymerase	0	Intracellular	1	0	0	13	HMW	53.53
3	A0A0K0FZN1	28.14	1	2	1	6.47	169.075	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	0	2	103	HMW	36.64
4	A0A0K0EVB3	20.47	0	1	1	5.8	152.102	Amidohydro-rel domain-containing protein	0	Intracellular	1	0	0	75	HMW	33.56
5	A0A0K0FYR1	21.22	0	1	1	9.43	149.357	RNase NYN domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	15	HMW	60.71
6	A0A0K0F456	24.48	0	1	1	6.54	143.255	Protein RIC1 homolog	0	UPS	1	0	0	32	HMW	63
7	A0A0K0FH30	31.75	1	3	3	6.18	136.095	Neuroglian	1	Signal peptide	0	1	3	7	HMW	33.56
8	A0A0K0FZT7	35.43	2	4	4	9.42	125.570	Histone-lysine N-methyltransferase	0	Intracellular	1	0	0	127	HMW	51.86
9	A0A0K0F830	20.39	0	1	1	6.68	118.003	Adenylate cyclase	0	Transmembrane	0	10	0	6	HMW	61.12
10	A0A0K0F465	20.82	1	1	1	9.64	114.595	Peroxidasin-like protein	1	Signal peptide	0	0	4	0	HMW	37.54
11	A0A0K0F0E3	20.24	1	1	1	4.99	111.147	Calsyntenin-1	1	Signal peptide	0	1	5	0	HMW	40.12
12	A0A0K0F3T7	38.03	3	2	2	6.45	109.957	Aminopeptidase EC 3.4.11.	0	UPS	1	0	0	0	HMW	53.72
13	A0A0K0FL11	21.3	1	1	1	7.04	107.659	Peroxidasin-like protein	1	Signal peptide	0	0	2	9	HMW	48.4
14	A0A0K0FAE3	20.82	1	1	1	6.66	103.459	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	0	0	HMW	37.29
15	A0A0K0FG75	20.93	1	1	1	6.82	102.918	Tudor domain-containing protein	0	Intracellular	1	0	0	15	HMW	35.28
16	A0A0K0EV85	21.42	1	1	1	6.05	94.563	Degenerin unc-8	0	Transmembrane	0	2	0	17	HMW	41.45

17	A0A0K0F9R3	22.05	1	1	1	4.87	89.934	Calpain-2 catalytic subunit	0	Intracellular	1	0	0	9	IMW	33.24
18	A0A0K0FK28	26.42	1	2	2	4.93	81.849	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	2	IMW	59.08
19	A0A0K0F4D9	31.78	1	1	1	5.94	78.412	Tr-type G domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	0	IMW	41.18
20	A0A0K0G0S7	54.4	4	2	2	6.03	73.944	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	0	Intracellular	1	0	0	3	IMW	32.9
21	A0A0K0FYM2	20.93	1	1	1	7.56	65.394	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	IMW	63.22
22	A0A0K0G292	77.38	10	5	5	6.52	62.193	Glucose-6-phosphate isomerase	0	UPS	1	0	0	0	IMW	39.57
23	A0A0K0F6Y2	21.22	1	1	1	7.16	58.413	X-ray repair cross-complementing protein 6	0	Intracellular	0	0	0	1	IMW	123.75
24	A0A0K0F9F9	50.83	5	2	2	5.89	57.563	Phosphoglycerate mutase	0	Intracellular	1	0	0	2	IMW	37
25	A0A0K0F6C3	101.1	15	8	8	6	55.676	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	0	IMW	36.14
26	A0A0K0FKU3	108.11	24	9	8	6.04	47.168	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Enolase)	0	UPS	1	0	0	0	LMW	31.07
27	A0A0K0EX00	20.02	3	1	1	6.04	46.015	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	0	UPS	1	0	0	0	LMW	40.9
28	A0A0K0G262	25.14	2	1	1	7.43	44.313	Uncharacterized protein	0	UPS	0	0	0	27	LMW	49.25
29	A0A0K0FV38	101.1	20	8	8	5.3	41.810	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	LMW	37.7
30	A0A0K0FL48	101.1	20	8	8	5.3	41.792	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	LMW	37.7
31	A0A0K0FYF9	104.31	26	7	7	8.91	40.957	Malate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	37.5
32	A0A0K0G1T0	22.9	1	1	1	10.33	40.668	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	1	41	LMW	34.73
33	A0A0K0FPH6	20.47	1	1	1	9.14	40.636	Inositol polyphosphate 5-phosphatase	0	UPS	0	0	0	4	LMW	69
34	A0A0K0F7B1	102.09	22	8	8	6.32	39.485	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	3	LMW	28.08

35	A0A0K0FTY1	26.24	5	1	1	7.51	38.707	Adenylate kinase isoenzyme 1	0	Transmembrane	0	1	0	16	LMW	34.7
36	A0A0K0EZR7	72.59	13	4	2	7.57	37.039	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	36.89
37	A0A0K0FH91	27.55	4	1	1	6.8	36.262	L-lactate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	67
38	A0A0K0FZ76	20.18	0	1	1	9.4	34.501	Uncharacterized protein	0	UPS	1	0	0	0	LMW	58.6
39	A0A0K0FW12	25.53	9	2	2	6.99	34.273	60S acidic ribosomal protein P0	0	Intracellular	1	0	0	3	LMW	52.5
40	A0A0K0FYU3	100.6	26	8	2	4.81	33.738	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	25.08
41	A0A0K0FDI0	21.33	1	1	1	9.11	32.832	CCHC-type domain-containing protein	0	UPS	1	0	0	2	LMW	58.2
42	A0A0K0F5G7	36.43	4	1	1	6.32	31.489	S-formylglutathione hydrolase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	69.75
43	A0A0K0FXA8	68.68	14	4	4	9.79	30.495	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	16	LMW	36.75
44	A0A0K0G0W1	20.04	2	1	1	8.33	30.150	Col_cuticle_N domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	0	LMW	74.25

A tabela mostra o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (PM) apenas da forma madura de cada proteína. A ferramenta SignalP 5.0 prediz se a proteína contém o peptídeo sinal para secreção pela via clássica; Oocyte prediz se a proteína é secretada mediante vias não convencionais (UPS), além de predizer se possui peptídeo sinal, região transmembrana, ou é intracelular. Exopred prediz se a proteína é secretada dentro de exossomos ou vesículas extracelulares. TMHMM 2.0 prediz se a proteína possui regiões transmembrana, bem como o número de regiões transmembrana. NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 4.0 predizem sítios de N-glicosilação e O-glicosilação nas proteínas, respectivamente, bem como o número de sítios de glicosilação. Fraction descreve o tipo de fração antigênica analisada (HMW = fração de alto PM, IMW = fração de PM intermédio, LMW = fração de baixo PM); Secret-AAR estima a abundância de regiões antigênicas (AAR). Forma de classificação para as ferramentas SignalP e Exopred: presença = 1; ausência = 0.

4.6.3. Análise dos produtos E/S-PBS por espectrometria de massas e bioinformática

A espectrometria de massas identificou um total de 62 proteínas nos produtos E/S-PBS com PMs que variaram entre 16,8 kDa e 589,5 kDa e um pI entre 4,8 a 9,6 (Anexos: Tabela suplementar 2). Dezesesseis proteínas (25,8%) tiveram um peptídeo sinal para ser liberadas através da via secretora clássica, 38 proteínas (61,3%) tiveram predição para ser liberadas dentro vesículas extracelulares ou exossomos e 8 proteínas (12,9%) foram consideradas como intracelulares ou não secretadas. De todas as proteínas identificadas nos produtos E/S-PBS, 14 proteínas (22,6%) tiveram entre 1 a 7 domínios transmembrana.

Por outro lado, a ferramenta OutCyte 1.0 também identificou 16 proteínas com peptídeo sinal, 12 proteínas (19,4%) tiveram evidencia de ser secretadas pela via não convencional e 31 proteínas (50%) foram consideradas como intracelulares. No entanto, apenas três proteínas tiveram domínios transmembrana.

Em relação ao tipo de glicosilação, 12 proteínas (19,4%) tinham entre 1 e 29 sítios de N-glicosilação, 44 proteínas (71%) tinham entre 1 e 341 sítios de O-glicosilação e 10 proteínas (16,1%) tiveram sítios para ambos os tipos de glicosilação (Anexos: Tabela suplementar 2).

Em relação à sua provável localização como componente celular, as proteínas identificadas estiveram relacionadas ao citoplasma (62,9%), à membrana celular (14,5%), à mitocôndria (9,7%), ao núcleo (8,1%), à região extracelular (3,2%) e ao aparato de Golgi (1,6%) (Anexos: Tabela suplementar 4).

Em termos de processo biológico, as proteínas identificadas estiveram envolvidas principalmente no metabolismo de carboidratos (14,5%), organização do citoesqueleto (12,9%), proteólise (12,9%), processos envolvendo fosforilação (11,3%), processos catabólicos (8,1%), sinalização celular (6,45%), processos envolvendo RNA (6,45%), processos biossintéticos (6,5%), estresse oxidativo (4,8%), desenvolvimento larval (3,2%), transporte de íons (3,2%), entre outros.

Em termos de função molecular, as proteínas identificadas estiveram envolvidas principalmente na ligação de ATP (17,7%), atividade quinase (14,5%), ligação de íons metálicos (12,9%), ligação de proteínas (12,9%), ligação de ácidos nucleicos (11,3%), atividade peptidase (6,45%), atividade transferase (6,45%), entre outros (Anexos: Tabela suplementar 4).

Entre as proteínas que tiveram maior cobertura de identificação, podemos citar: três isoformas de arginine kinase de 37 kDa (30% de cobertura), 40,5 kDa (11% de cobertura) e 45,3 kDa (11% de cobertura); malate dehydrogenase (PM = 40,9 kDa; 19% de cobertura); 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase ou enolase (PM = 47,2 kDa; 18% de cobertura); três isoformas de actin, alpha cardiac muscle de 40,7 kDa, 40,8 kDa (ambas com 17% de cobertura) e de 50,7 kDa (12% de cobertura); ADF-H domain-containing protein (PM = 16,8 kDa; 14% de cobertura) e fructose-bisphosphate aldolase (PM = 39,5 kDa; 12% de cobertura).

Houve um total de 20 proteínas em comum entre os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS das quais, 16 proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

4.6.4. Espectrometria de massas e análise bioinformática das frações antigênicas dos produtos E/S-PBS

Quarenta e quatro proteínas foram identificadas nas três frações selecionadas dos produtos E/S-PBS: 7 proteínas (15,9%) tinham um peptídeo sinal a ser liberadas através da via secretora clássica, 29 proteínas (65,9%) tiveram evidência de ser liberadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 8 proteínas (18,2%) foram consideradas intracelulares.

Trinta proteínas (68,2%) tiveram sítios para serem O-glicosiladas (10 proteínas na fração HMW, 13 proteínas na fração IMW e 7 proteínas na fração LMW); 8 proteínas (18,2%) tiveram sítios para serem N-glicosiladas (2 proteínas na fração HMW, 3 proteínas na fração IMW e 3 proteínas na fração LMW) e 7 proteínas tiveram sítios para ambos os tipos de glicosilação (1 proteína na fração HMW, 3 proteínas na fração IMW e 3 proteínas na fração LMW).

Trinta proteínas (68,2%) foram classificadas pela ferramenta Secret-AAR como potencialmente antigênicas, com valores AAR entre 24,6 e 49,78 (Tabela 7).

Em relação ao componente celular, as proteínas identificadas estiveram relacionadas principalmente ao citoplasma (31,8%), ao núcleo (20,4%), à membrana celular (13,6%) e ao citoesqueleto (13,6%). Em termos de processo biológico, as proteínas estiveram envolvidas principalmente no processo catabólico (15,9%), processo biossintético (15,9%), fosforilação (13,6%), processo metabólico de carboidratos (6,8%), proteólise (6,8%), processo apoptótico (6,8%), e

desenvolvimento larval (4,5%). Em termos de função molecular, as proteínas estiveram envolvidas principalmente na ligação de ATP (25%), atividade de quinase (22,8%), ligação de íons metálicos (20,5%), ligação de proteínas (18,2%), atividade transferase (6,8%), atividade peptidase (6,8%) e atividade desidrogenase (6,8%).

Na fração HMW, 11 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (2 proteínas com peptídeo sinal, 4 proteínas secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 5 proteínas consideradas intracelulares); 7 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre essas proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados do WB, observa-se uma proteína não caracterizada de 102,4 kDa ($pI = 6,04$), calsynenin-1 (111,15 kDa; $pI = 4,99$), protein transport protein sec16 (204,68 kDa; $pI = 5,17$), non-specific serine/threonine protein kinase (208,13 kDa; $pI = 8,83$).

Na fração IMW, 15 proteínas foram identificadas (2 proteínas com peptídeo sinal, 12 proteínas secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 5 proteínas consideradas intracelulares) e 12 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre essas proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados do WB, observa-se a retinal dehydrogenase 2 (55,11 kDa; $pI = 5,78$), alanine aminotransferase 1 (55,57 kDa; $pI = 8,35$), actin, alpha cardiac muscle 1 (55,67 kDa; $pI = 6$), phosphoglycerate mutase (57,56 kDa; $pI = 5,89$), glucose-6-phosphate isomerase (62,19 kDa; $pI = 6,52$), proteína não caracterizada de 66,2 kDa ($pI = 6,88$), septin-2 (67,28 kDa; $pI = 8,68$), malic enzyme (71,99 kDa; $pI = 8,91$), phosphoenolpyruvate carboxykinase (73,94 kDa; $pI = 6,03$) e o neuroglian (77,24 kDa; $pI = 8,04$).

Na fração LMW, 18 proteínas foram identificadas (3 proteínas com peptídeo sinal, 13 proteínas secretadas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e 2 proteínas consideradas intracelulares); 11 dessas proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

Dentre essas proteínas que se destacam pelo seu potencial antigênico e PM semelhante aos resultados de WB, observa-se a peptidase S1 domain-containing protein (30,56 kDa; $pI = 8,6$), 14-3-3 protein zeta (33,74 kDa; $pI = 4,81$), uma proteína não caracterizada de 33,83 kDa ($pI = 6,19$), dois isoformas de arginine

kinase of 37,04 kDa ($pI = 7,57$) e de 40,54 kDa ($pI = 8,37$), dois isoformas de fructose-bisphosphate aldolase de 39.5 kDa ($pI = 6,32$ e $7,98$), malate dehydrogenase (40,96 kDa; $pI = 8,91$), dois isoformas de actin, alpha cardiac muscle 1 de 41,79 kDa e 41,81 kDa ($pI = 5,3$) e 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase ou enolase (47,17 kDa; $pI = 6,04$).

Houve 14 proteínas em comum entre as frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS (1 proteína com peptídeo sinal, 11 proteínas liberadas dentro vesículas extracelulares ou exossomos e 2 proteínas intracelulares), das quais 12 proteínas foram consideradas potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$).

O diagrama de dispersão feito entre o pI (x) e o PM (y) de todas as proteínas com potencial antigênico das três frações antigênicas (HMW, IMW e LMW) mostrou uma similitude com os resultados obtidos na reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo contra os produtos E/S-PBS mediante WB bidimensional, mostrando uma vez mais que a ferramenta bioinformática Secret-AAR pode ser útil para qualificar quais proteínas possuem um potencial antigênico (Figura 14).

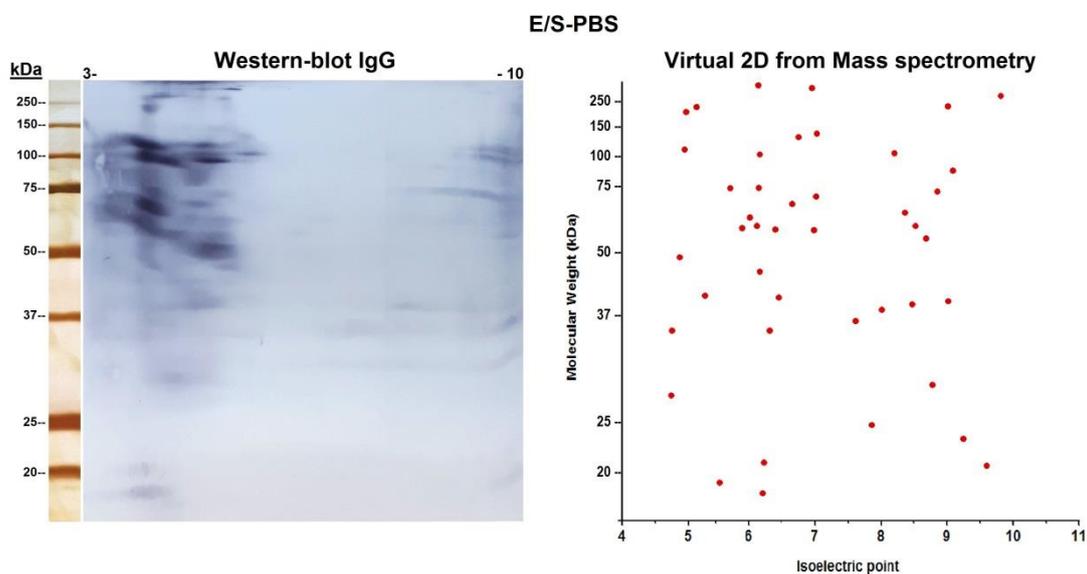


Figura 16. Gráfico de dispersão (ponto isoeletrico = x e peso molecular em kDa = y) das proteínas identificadas nas três frações antigênicas dos produtos E/S-RPMI (direita) e sua similaridade com os resultados obtidos no WB bidimensional para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG do soro controle positivo (esquerda).

Tabela 7

Identificação de proteínas nas três frações antigênicas (LMW, IMW e HMW)
dos produtos E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis* por espectrometria de massas

N°	Uniprot accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Uniq	pI	PM	Description	SignalP	Outcyte	ExoPred	TMHMM 2.0	N-Glyc	O-Glyc	Fraction	AAR value
1	A0A0K0EXN8	29.48	1	2	0	8.83	208.133	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	Intracellular	0	0	0	279	HMW	39.19
2	A0A0K0EW98	29.81	1	2	2	5.17	204.682	Protein transport protein sec16	0	Intracellular	1	0	0	131	HMW	35.82
3	A0A0K0EUC6	20.4	2	1	1	5.01	191.875	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	15	101	HMW	38.87
4	A0A0K0G111	29.27	0	2	2	7.66	172.431	ELYS-bb domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	130	HMW	60.44
5	A0A0K0G049	25.46	1	2	2	6.89	131.877	Short transient receptor potential channel 4	0	Intracellular	0	4	0	42	HMW	46.16
6	A0A0K0FYF3	25.63	1	2	2	6.62	123.604	Delphilin	0	Intracellular	1	0	0	51	HMW	39.96
7	A0A0K0FB18	22.08	1	1	1	8.62	112.967	Anchor cell fusion failure-1	0	Transmembrane	0	7	0	4	HMW	75.38
8	A0A0K0F0E3	20.24	1	1	1	4.99	111.147	Calsyntenin-1	1	Signal peptide	0	1	5	0	HMW	40.12
9	A0A0K0F9S9	20.13	1	1	1	8.77	103.181	[Heparan sulfate]-glucosamine N-sulfotransferase	0	Transmembrane	0	1	0	2	HMW	63.14
10	A0A0K0FXN2	23.6	0	2	1	6.04	102.390	Uncharacterized protein	0	UPS	1	1	0	20	HMW	49.78
11	A0A0K0G3F0	29.19	1	1	1	6.31	96.050	Doublecortin-like and CAM kinase-like protein	0	Intracellular	1	0	0	57	HMW	60.64
12	A0A0K0FCT6	20.38	1	1	1	6.38	82.694	Receptor protein serine/threonine kinase	0	Transmembrane	0	2	5	6	IMW	51.57
13	A0A0K0G523	24.94	1	2	2	8.04	77.240	Neuroglian	1	Signal peptide	0	1	11	5	IMW	49.07
14	A0A0K0G0S7	71.32	9	4	3	6.03	73.944	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	0	Intracellular	1	0	0	3	IMW	32.9

15	A0A0K0F7R7	24.54	2	2	2	5.59	73.643	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	IMW	45.64
16	A0A0K0FD75	33.42	3	2	2	8.91	71.998	Malic enzyme	0	Intracellular	1	0	0	5	IMW	39.88
17	A0A0K0FB44	25.98	1	2	1	8.68	67.288	Septin-2	0	Intracellular	1	0	0	33	IMW	36.69
18	A0A0K0FUU8	21.04	1	1	1	6.88	66.197	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	4	IMW	46.33
19	A0A0K0EX33	25.3	0	2	2	8.8	62.853	Pct-1	0	Intracellular	1	0	0	56	IMW	55.7
20	A0A0K0G292	47.93	3	2	2	6.52	62.193	Glucose-6-phosphate isomerase	0	UPS	1	0	0	0	IMW	39.57
21	A0A0K0EZM4	29.68	3	1	1	8.19	58.664	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	IMW	41.15
22	A0A0K0EZX9	27.94	1	2	1	9.15	58.524	Phosphate-regulating neutral endopeptidase	1	Signal peptide	0	1	7	14	IMW	52.5
23	A0A0K0F9F9	36.71	3	2	1	5.89	57.563	Phosphoglycerate mutase	0	Intracellular	1	0	0	2	IMW	37
24	A0A0K0F6C3	75.11	12	4	4	6	55.676	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	1	0	0	0	IMW	36.14
25	A0A0K0FUR4	23.71	4	1	1	8.35	55.573	Alanine aminotransferase 1	0	Intracellular	1	0	0	5	IMW	45.55
26	A0A0K0FTW4	37.89	6	2	2	5.78	55.112	Retinal dehydrogenase 2	0	Intracellular	1	0	0	2	IMW	42.58
27	A0A0K0FKU3	80.55	18	8	8	6.04	47.168	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Enolase)	0	UPS	1	0	0	0	LMW	31.07
28	A0A0K0G2Q6	54.88	11	3	2	8.97	45.306	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	50.38
29	A0A0K0FXC6	23.01	1	1	1	9.47	42.046	Metalloendopeptidase	1	Signal peptide	0	0	1	2	LMW	63.83
30	A0A0K0FV38	87.23	17	6	6	5.3	41.810	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	LMW	37.7
31	A0A0K0FL48	87.23	17	6	6	5.3	41.792	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	LMW	37.7
32	A0A0K0FYF9	105.62	19	7	3	8.91	40.957	Malate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	LMW	37.5

33	A0A0K0FGG6	54.88	11	3	2	8.37	40.544	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	3	LMW	40.11
34	A0A0K0G127	23.12	2	1	1	7.98	39.501	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	45.88
35	A0A0K0F7B1	110.64	12	5	5	6.32	39.485	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	28.08
36	A0A0K0EZR7	113.86	30	9	2	7.57	37.039	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	3	LMW	36.89
37	A0A0K0FH91	33.3	4	1	1	6.8	36.262	L-lactate dehydrogenase	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	67
38	A0A0K0FXE7	27.13	1	2	2	9.21	34.073	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	58
39	A0A0K0EYE0	21.99	3	1	1	6.19	33.828	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	41.57
40	A0A0K0FYU3	45.27	4	1	1	4.81	33.738	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	25.08
41	A0A0K0EWQ2	57.93	9	3	3	7.06	33.296	Galectin	1	Signal peptide	0	0	2	4	LMW	52
42	A0A0K0F8N8	30.46	1	2	2	9.46	31.520	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	269
43	A0A0K0F5G7	52.05	4	1	1	6.32	31.489	S-formylglutathione hydrolase	0	Intracellular	1	0	0	0	LMW	69.75
44	A0A0K0G0W4	22.15	2	1	1	8.6	30.567	Peptidase S1 domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	2	5	LMW	42.57

A tabela mostra o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (PM) apenas da forma madura de cada proteína. A ferramenta SignalP 5.0 prediz se a proteína contém o peptídeo sinal para secreção pela via clássica; Oocyte prediz se a proteína é secretada mediante vias não convencionais (UPS), além de predizer se possui peptídeo sinal, região transmembrana, ou é intracelular. Exopred prediz se a proteína é secretada dentro de exossomos ou vesículas extracelulares. TMHMM 2.0 prediz se a proteína possui regiões transmembrana, bem como o número de regiões transmembrana. NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 4.0 predizem sítios de N-glicosilação e O-glicosilação nas proteínas, respectivamente, bem como o número de sítios de glicosilação. Fraction descreve o tipo de fração antigênica analisada (HMW = fração de alto PM, IMW = fração de PM intermédio, LMW = fração de baixo PM); Secret-AAR estima a abundância de regiões antigênicas (AAR). Forma de classificação para as ferramentas SignalP e Exopred: presença = 1; ausência = 0.

4.7. Análise *in silico* da arginina quinase de 37 kDa

A análise BLAST da arginina quinase de 37 kDa com potencial antigênico (Uniprot ID: A0A0K0EZR7), identificada na fração LMW de ambos os tipos de produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, mostrou que a proteína possui um 65,3% de identidade com a isoforma de 40,5 kDa (A0A0K0FGG6) e 55,5% com a isoforma de 45,3 kDa (A0A0K0G2Q6) que foram identificadas apenas nos produtos E/S-PBS. O alinhamento múltiplo de sequências das três argininas quinase identificadas neste estudo permitiu observar que a arginina quinase de 37 kDa possui uma deleção de 27 aminoácidos na região C-terminal (Figura 17).

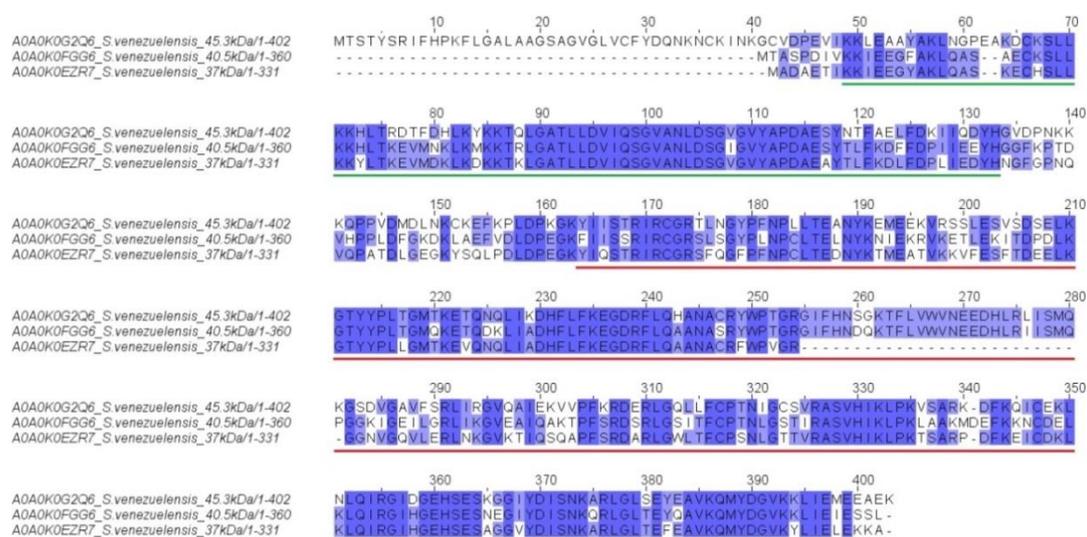


Figura 17. Alinhamento múltiplo das três sequências de arginina quinase identificadas em ambos os tipos de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. Os aminoácidos altamente conservados são mostrados em azul escuro e os medianamente conservados, em azul claro. Os domínios N-terminal e C-terminal fosfatase foram sublinhados em verde e vermelho, respectivamente.

Em relação a sua identidade com homólogos em outras espécies do gênero *Strongyloides*, a análise BLAST mostrou que a arginina quinase de 37 kDa possui um 90,8% de identidade com seu homólogo de 41,6 kDa presente em *S. papillosus* (A0A0N5BQM2), 88,5% de identidade com seu homólogo de 40,3 kDa presente em *S. ratti* (A0A090KYR4), e 88% de identidade com seu homólogo de 42,1 kDa presente em *S. stercoralis* (A0A0K0DZN6). Uma árvore filogenética com as

diferentes sequências de arginina quinase das espécies do gênero *Strongyloides* é mostrada na Figura 18.

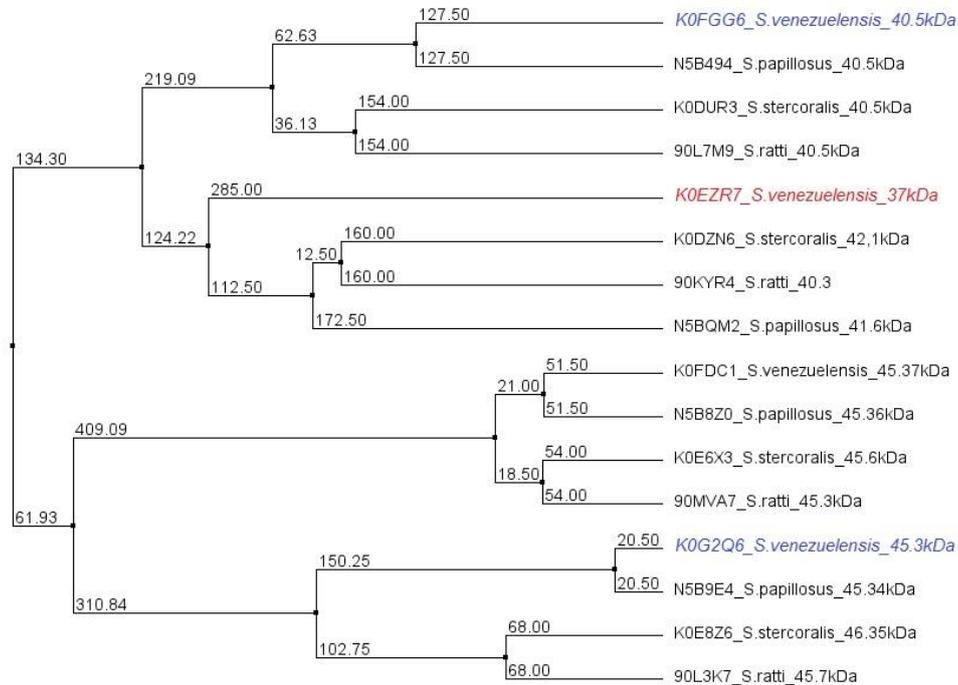


Figura 18. Reconstrução filogenética das argininas quinase identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* (ressaltadas em vermelho e azul), e a sua similaridade com seus homólogos presentes nas outras espécies do gênero *Strongyloides*. O fenograma também inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA).

A análise BLAST feita com homólogos presentes em outros nematódeos parasitos, mostrou que a proteína em menção tem 76,3% de identidade com seu homólogo presente em *N. americanus* (A0A0K0DZN6). No caso das outras isoformas de arginina quinase identificadas no presente estudo, a isoforma de 40,5 kDa resultou ser mais próxima do gênero *Strongyloides*, enquanto que a isoforma de 45,3 kDa resultou ter mais similaridade com os homólogos de *A. lumbricoides* e *T. canis*. Uma árvore filogenética com os homólogos de arginina quinase presentes nos diferentes nematódeos parasitos é mostrada na Figura 19.

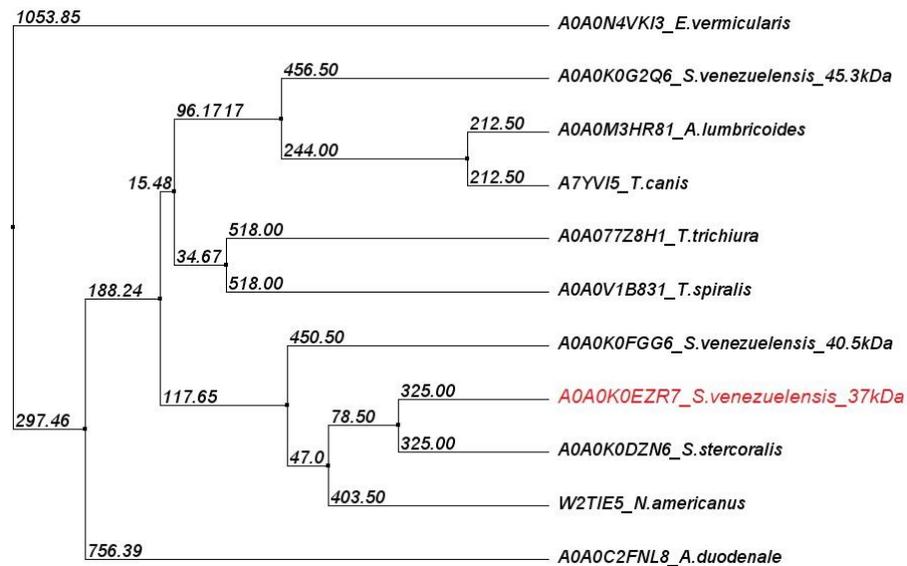


Figura 19. Reconstrução filogenética das argininas quinase de 37 kDa (letras vermelhas), 40,5 kDa e 45,3 kDa identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e a sua similaridade com seus homólogos presentes em outros nematódeos parasitos. O fenograma também inclui os valores resultantes do algoritmo de distancias médias (Método UPGMA).

4.7.1. Detecção de epítomos antigênicos potenciais da arginina quinase de 37 kDa

A análise feita com a ferramenta Bepipred 1.0 mostrou que a arginina quinase de 37 kDa possui pelo menos nove epítomos antigênicos específicos distribuídos em sete regiões potencialmente antigênicas e que são compartilhados apenas com seu homólogo presente em *S. stercoralis* (Figura 20). Da mesma forma, a ferramenta Ellipro encontrou até onze epítomos antigênicos distribuídos em seis regiões potencialmente antigênicas, enquanto que a ferramenta Bepipred 2.0 encontrou apenas sete epítomos antigênicos distribuídos em cinco regiões potencialmente antigênicas (Tabela 8).

Tabela 8

Identificação de regiões potencialmente antigênicas e epítotos lineares na arginina quinase de 37 kDa por três ferramentas bioinformáticas

Região	Bepipred 1.0	Bepipred 2.0	Ellipro
1	<u>MADAETIKK</u>	<u>ETIKKIEEGYAKLQAS</u>	<u>MADAETIKKIEEGYAKLQASKECHS</u>
2	-	-	KKYLTKEVMDKLDKDKKTKLGA
3	<u>HNGFGPNQVOPATD</u>	IEDY <u>HNGFGPNQVOPAT</u>	<u>HNGFGPNQVOPATD</u>
4	<u>LGEKGYSQLPDLDP</u> EGKYI	<u>DLGEGKYSQLPDLDP</u> EG	<u>LGEKGYSQLPDLDP</u> EGKY
5	CLTEDNYKTME	-	-
6	<u>DEELKG</u>	FESFT <u>DEELKGT</u> YY	ATVKKVFESFT <u>DEELKGT</u> Y
7	<u>KTSARPDF</u>	<u>KTSARPDF</u>	KLP <u>KTSARPDF</u> KEICDKL
8	GEHSES <u>AGGVYDI</u>	-	-

*Os epítotos antigênicos lineares foram ressaltados em negrita e também sublinhados quando foram identificados simultaneamente pelas três ferramentas bioinformáticas.

4.7.2. Estrutura secundária e modelagem molecular da arginina quinase de 37 kDa

A arginina quinase de 37 kDa identificada nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* é composta por uma cadeia de 331 aminoácidos dos quais o 39,88% formam cadeias α -hélices e 11,18% formam cadeias folha- β pregueada; o restante dos aminoácidos formam alças simples (Figura 21).

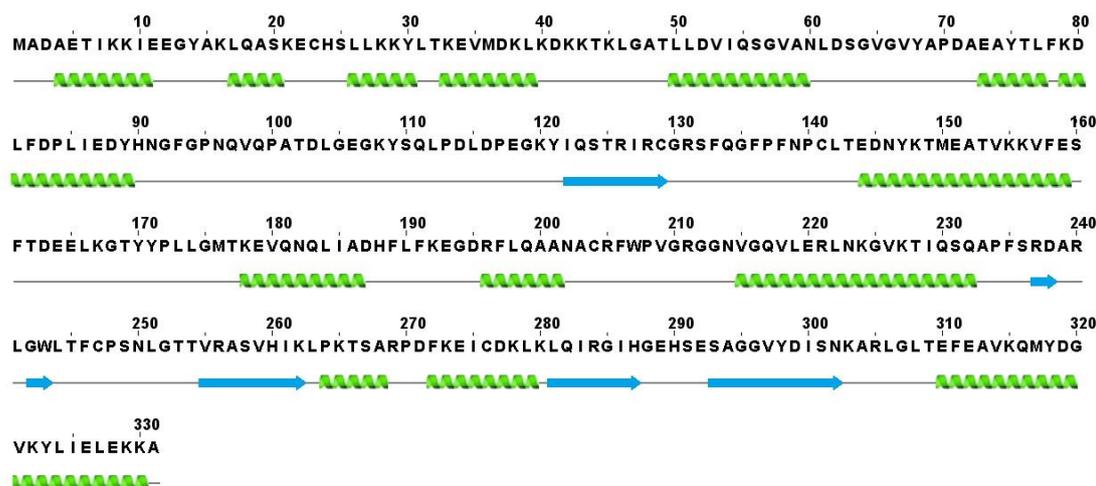


Figura 21. Estrutura secundária da arginina quinase de 37 kDa identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, composta por cadeias α -hélices (verde), folha- β pregueada (celeste) e alças livres (cinza).

A modelagem molecular feita com o programa Phyre2 permitiu evidenciar que todas as regiões potencialmente antigênicas anteriormente mencionadas encontram-se localizadas na superfície da proteína (Figura 22).

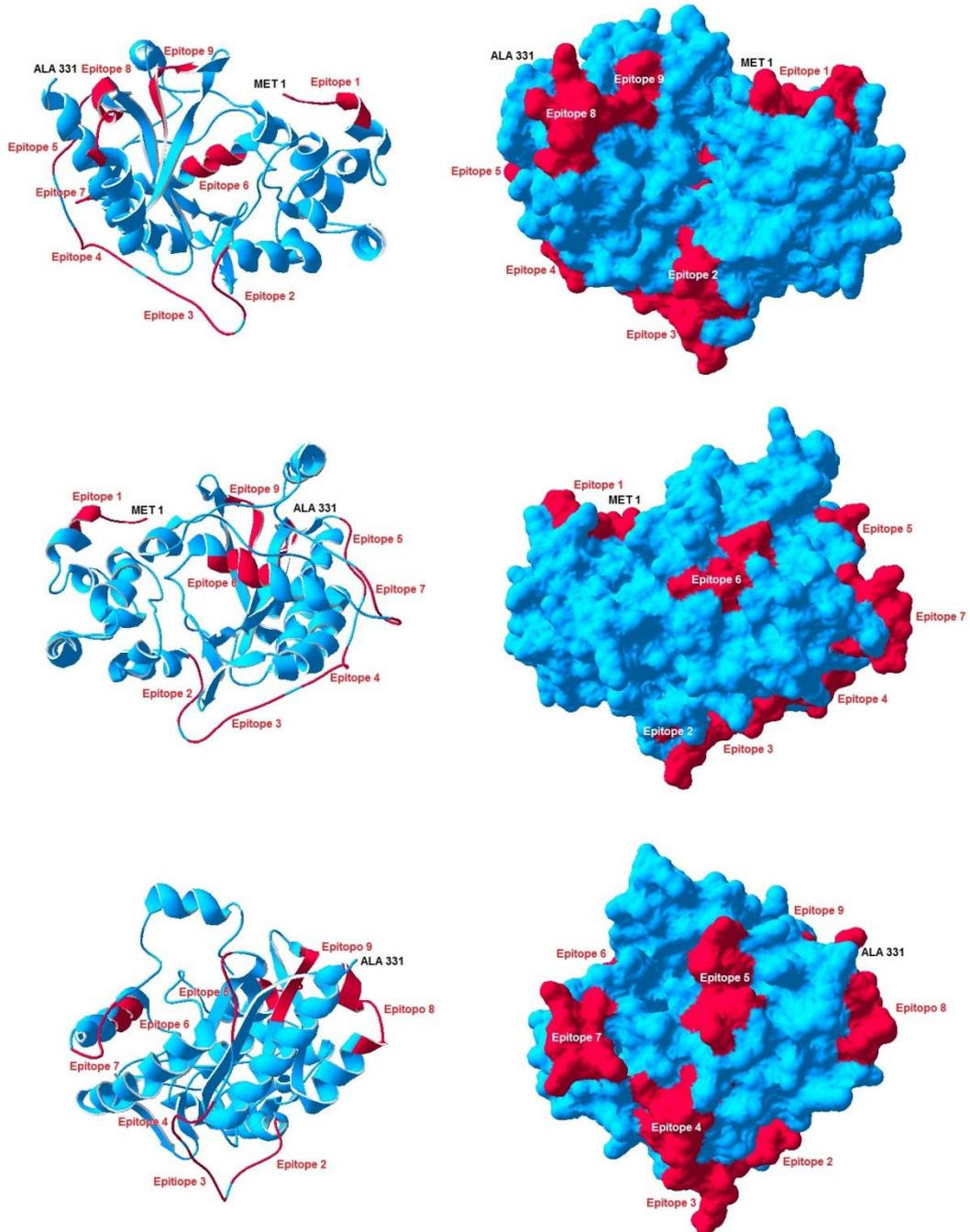


Figura 22. Três vistas diferentes do modelo tridimensional da arginina quinase de 37 kDa (Uniprot ID: A0A0K0EZR7) em representação tipo *ribbons* mostrando as diferentes estruturas secundárias (esquerda) e em representação tipo *molecular surface* (direita). O modelo mostra o início (MET 1) e o fim (ALA 331) da cadeia polipeptídica e a localização dos nove epítomos antigênicos lineares identificados pela ferramenta Bepipred 1.0 (vermelho) que se detalham na Figura 18.

O modelo tridimensional da arginina quinase de 37 kDa também permitiu evidenciar que os epítomos antigênicos identificados apenas pelas ferramentas Bepipred 2.0 ou Ellipro (Tabela 17) não estiveram localizados na superfície e, portanto, seriam menos prováveis de ser reconhecidos pelos anticorpos.

4.8. Análise *in silico* da enolase de 47 kDa

A análise BLAST da enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* (Uniprot ID: A0A0K0FKU3), mostrou um 99,5% de identidade com o homólogo de presente em *S. papillosus* (A0A0N5BNN1), 95,4% de identidade com *S. ratti* (A0A090MVT2) e 94,5% de identidade com *S. stercoralis* (A0A0K0EI07). Do mesmo modo, a enolase de *S. venezuelensis* teve 85,3% de identidade com o homólogo presente em *Caenorhabditis elegans* (Q27527) e 84,6% de identidade com os ancilostomídeos *N. americanus* (W2TEQ5) e *A. duodenale* (A0A0C2DNA4). Uma árvore filogenética das sequências de enolase, presentes nas diferentes espécies de helmintos, mamíferos, fungos e bactérias, é mostrada na Figura 23.

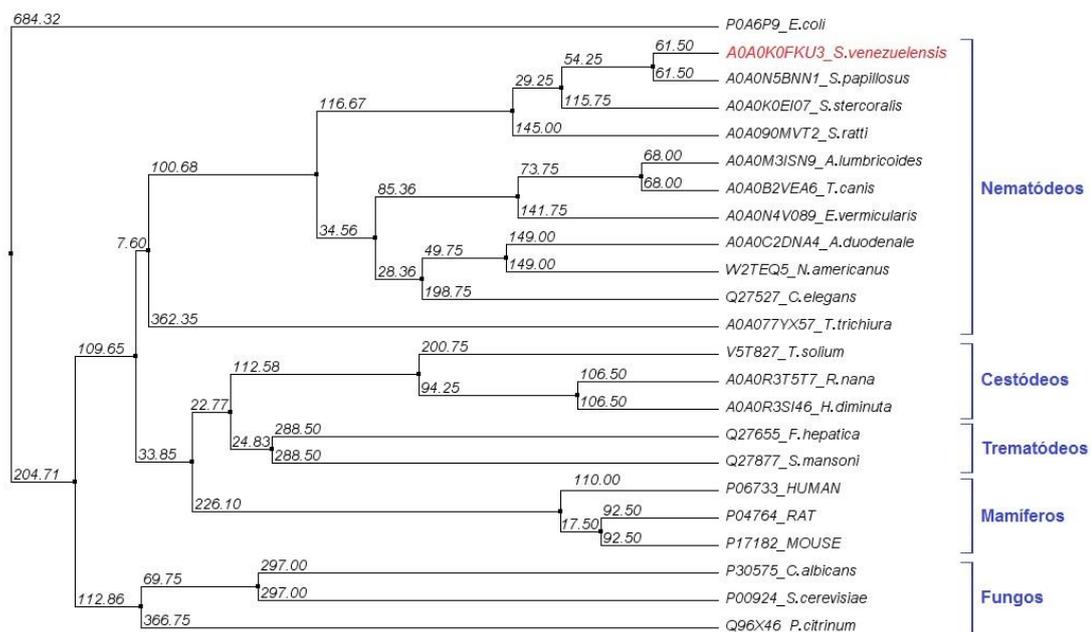


Figura 23. Reconstrução filogenética da enolase de 47 kDa de *S. venezuelensis* (vermelho) e sua relação com outros homólogos presentes em outros nematódeos, cestódeos, trematódeos, mamíferos e fungos. Uma sequência de enolase da bactéria *Escherichia coli* foi incluída como referência. O fenograma inclui os valores resultantes do algoritmo de distâncias médias (Método UPGMA).

4.8.1. Detecção de epítomos antigênicos potenciais da enolase de 47 kDa

A análise feita com a ferramenta Bepipred 1.0 mostrou que a enolase de iL3 de *S. venezuelensis* possui pelo menos quinze regiões potencialmente antigênicas, das quais apenas uma região contém especificidade para o gênero *Strongyloides* e duas regiões antigênicas possuem especificidade apenas para *S. venezuelensis*, *S. papillosus* ou *S. ratti*. Nove regiões antigênicas tiveram reatividade cruzada com outros helmintos (principalmente com *A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *T. canis*, *T. solium* e *F. hepatica*) e três regiões antigênicas tiveram reatividade cruzada com todas as espécies (helmintos, mamíferos, fungos e bactérias) (Tabela 9).

A ferramenta Bepipred 2.0 encontrou onze regiões potencialmente antigênicas, das quais duas regiões possuem epítomos específicos para o gênero *Strongyloides* e duas regiões possuem epítomos específicos apenas para *S. venezuelensis* e *S. papillosus* ou *S. ratti*. Sete regiões antigênicas tiveram reatividade cruzada com nematódeos e cestódeos (principalmente com *A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *S. mansoni* e *F. hepatica*) (Tabela 9).

Por outro lado, a ferramenta Ellipro encontrou dezesseis regiões potencialmente antigênicas, das quais cinco regiões possuem epítomos específicos para o gênero *Strongyloides* e duas regiões possuem epítomos específicos apenas para *S. venezuelensis* e *S. papillosus* ou *S. ratti*. Nove regiões antigênicas tiveram reatividade cruzada com nematódeos e cestódeos (principalmente com *A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *S. mansoni* e *F. hepatica*) inclusive uma região delas teve reatividade cruzada com fungos (Tabela 9).

4.8.2. Identificação do sítio potencial para ligação ao plasminogênio

Vários estudos têm demonstrado que a enolase de diferentes organismos patogênicos possui a capacidade de capturar moléculas de plasminogênio, a qual pode logo ser ativada em plasmina, uma serina protease que degrada diversas proteínas do plasma sanguíneo, principalmente os coágulos de fibrina (fibrinólise). De essa forma, os organismos patogênicos conseguem degradar a matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro, durante sua invasão e colonização.

A enolase de 47 kDa, identificada nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, contém a sequência “SEFYKDGKY”, sendo similar ao sítio de união ao plasminogênio “SEFYDKERKVY” que possui a enolase da bactéria patogênica

Streptococcus pneumoneae (Bergmann et al. 2003). Sequências similares foram encontradas em enolases de outros parasitos (Ayón-Núñez et al. 2018). A Figura 24 mostra o alinhamento múltiplo de sequências similares ao sitio de união do plasminogênio encontradas nas diferentes espécies de helmintos, protozoários, fungos, bactérias e mamíferos.

Tabela 9

Identificação de regiões potencialmente antigênicas e epítomos lineares da enolase de *S. venezuelensis* por três ferramentas bioinformáticas

Bepipred 1.0	Bepipred 2.0	Ellipro	Especificidade
-	-	MAILKIH	<i>Strongyloides</i> sp.
MRDGDKAVH	-	NINEKIAPSLI	<i>Strongyloides</i> sp.
-	FNVTDQV	KNFNVTDQV	<i>Strongyloides</i> sp.
-	-	IDRFMIE	<i>Strongyloides</i> sp.
-	TNVKRIQTAIE	QTAIEKKS	<i>Strongyloides</i> sp.
GAAEAGM	AKLAGTEKV	TGASNFKE	<i>S. venezuelensis</i> e <i>S. papillosus</i>
ELGDGAVY	DGAVYAGQKFRN	GDGAVY	<i>S. venezuelensis</i> e <i>S. ratti</i>
VPSGASTG	-	-	Todas as espécies
RSGETE	-	-	Todas as espécies
GGSHAG	-	LRIEEEL	Todas as espécies
-	-	AVHHGKGVLNA	<i>A. lumbricoides</i>
YDSRGNPTVEVDLTT	-	-	<i>A. lumbricoides</i> , <i>E. vermicularis</i>
FYKDGKYDLDFKNPNS	-	-	<i>A. lumbricoides</i> , <i>E. vermicularis</i>
KFRNPQ	HEALEMRDGDKAVHHGK	DLLNTAI	<i>A. lumbricoides</i> , <i>E. vermicularis</i> , <i>T. canis</i>
-	DQDDWE	QDDWENW	<i>A. duodenale</i> , <i>N. americanus</i> , <i>E. vermicularis</i> e <i>S. mansoni</i>
-	KKRYGLD	YHHLKAEIKKRYGLDATAV	Nematódeos
TAVGDEGGFAPNIQDNKE	NIQDNKE	HARQIYD	Nematódeos
DAFDQDDW	-	-	Nematódeos
SVTESI	-	-	Nematódeos e <i>T. solium</i>
-	KDGKYDLDFKNPNS	YKDGKYDLDFKNPNS	Nematódeos, trematódeos e fungos
DGTPKNHL	LDGTPNK	LDGTPNK	<i>F. hepatica</i>
-	-	AGAAEAG	<i>S. mansoni</i>
	HAGNKL	-	Helmintos
VGDEGGFAP	-	-	Helmintos
QIKTGAPCR			Helmintos

<i>A0A0K0FKU3_S.venezuelensis</i>	249	SEFYKDG	--	KY	257
<i>A0A0N5BNN1_S.papillosus</i>	249	SEFYKDG	--	KY	257
<i>A0A090MVT2_S.ratti</i>	268	SEFYKDG	--	KY	276
<i>A0A0K0EI07_S.stercoralis</i>	249	SEFYKDG	--	KY	257
<i>A0A0C2DNA4_A.duodenale</i>	277	SEFFKKG	--	KY	285
<i>W2TEQ5_N.americanus</i>	249	SEFFKKG	--	KY	257
<i>A0A0M3ISN9_A.lumbricoides</i>	249	SEFYKAEKKY			259
<i>A0A0B2VEA6_T.canis</i>	249	SEFYKADEKKY			259
<i>Q7YZX3_O.volvulus</i>	249	SEYSKEADKLY			259
<i>A0A0N4V089_E.vermicularis</i>	257	SEFYKAEKKY			267
<i>A0A2P1AM74_T.solium</i>	248	SEFYKDG	--	LY	256
<i>T1WGD6_T.pisiformis</i>	249	SEFYQNG	--	KY	257
<i>A0A0R3T5T7_R.nana</i>	249	SEFYQKG	--	KY	257
<i>A0A0R3SI46_H.diminuta</i>	249	SEFYQNG	--	KY	257
<i>Q27655_F.hepatica</i>	248	SEFYKEG	--	KY	256
<i>Q27877_S.mansoni</i>	249	SEFHKNG	--	KY	257
<i>P51555_E.histolytica</i>	247	SEFYNEETKKY			257
<i>Q3HL75_L.mexicana</i>	247	SEAYDAERKMY			257
<i>Q4DZ98_T.cruzi</i>	247	SETYDENKKQY			257
<i>B9PH47_T.gondii</i>	256	SEFYKQDEKKY			266
<i>P0A6P9_E.coli</i>	250	SEFYKDG	--	KY	258
<i>Q97QS2_S.pneumoniae</i>	*246	SEFYDKERKVV			256*
<i>P30575_C.albicans</i>	252	SEFYKDG	--	KY	260
<i>P00924_S.cerevisiae</i>	251	SEFFKKG	--	KY	259
<i>Q96X30_A.fumigatus</i>	250	SEFYKADVKKY			260
<i>P06733_Human</i>	249	SEFFRSG	--	KY	257
<i>P04764_Rat</i>	249	SEFYRAG	--	KY	257
<i>P17182_Mouse</i>	249	SEFYRSG	--	KY	257

Figura 24. Alinhamento múltiplo de sequências similares ao sítio de união do plasminogênio presente em *S. pneumoneae* (*), identificada tanto na enolase de 47 kDa de iL3 de *S. venezuelensis* (vermelho), quanto em homólogos de outras espécies de helmintos, protozoários, bactérias, fungos e mamíferos. Os aminoácidos altamente conservados são mostrados em azul escuro e os medianamente conservados, em azul claro. O código Uniprot de cada proteína está descrita à esquerda do nome científico de cada espécie.

4.8.3. Estrutura secundária e modelagem 3D da enolase de 47 kDa

A enolase de 47 kDa identificada nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* é composta por uma cadeia de 434 aminoácidos dos quais o 39,4% formam cadeias α -hélices e 16,13% formam cadeias folha- β pregueada; o restante dos aminoácidos formam alças simples (Figura 25).

Resulta interessante destacar que a sequência “SEFYKDGKY” (similar ao sítio de união ao plasminogênio da bactéria *S. pneumoneae*) forma uma estrutura composta por duas pequenas cadeias folha- β pregueada de dois aminoácidos cada (tirosina e lisina) e separadas por apenas dois aminoácidos tipo alça (ácido aspártico e glicina) (Figura 25). No caso da bactéria *S. pneumoneae*, esta sequência também possui duas pequenas cadeias folha- β pregueada formada por dois aminoácidos cada (tirosina e ácido aspártico ou valina) separadas, neste caso, por quatro aminoácidos

tipo alça (lisina, ácido glutâmico, arginina e lisina) (Figura 24). Embora a sequência de aminoácidos possa ter certa variação entre as diferentes espécies, a estrutura secundária permanece conservada, podendo ser a chave para o reconhecimento e união ao plasminogênio.

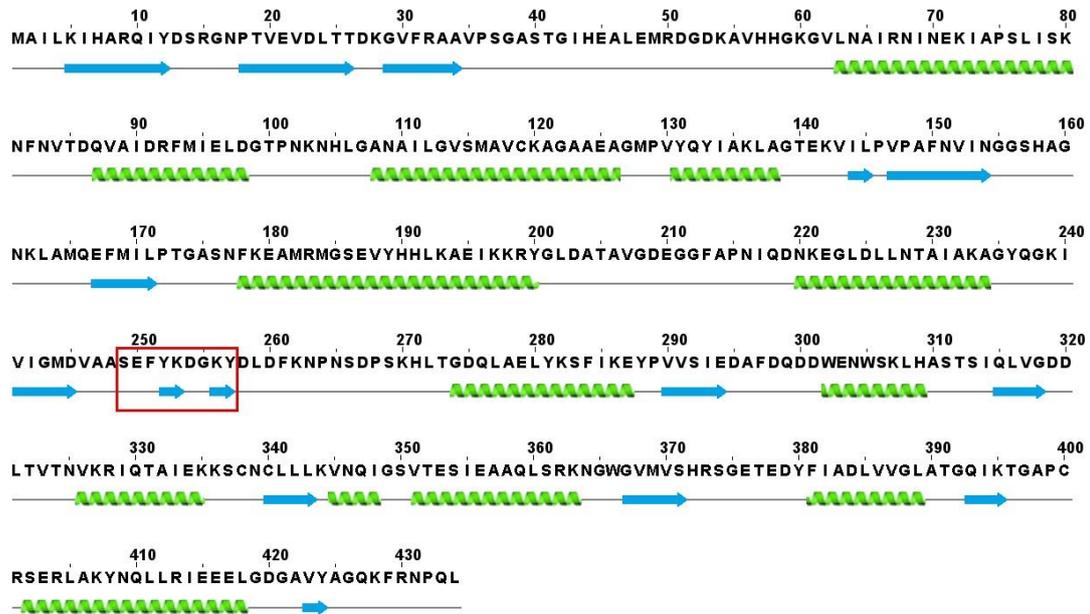


Figura 25. Estrutura secundária da enolase de 47 kDa, identificada nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, composta por cadeias α -hélices (verde), folha- β pregueada (celeste) e alças (cinza). O quadro vermelho indica a sítio de união ao plasminogênio, similar a sequências encontradas em enolases de outros organismos patogênicos.

O modelo tridimensional da enolase de 47 kDa de iL3 de *S. venezuelensis* (Figura 26) mostra que a proteína possui uma estrutura similar a um feijão, com exposição aberta para mostrar livremente o sítio de união ao plasminogênio, descrito nas figuras 24 e 25. Osorio-Aguilar et al. (2021) demonstraram que a união entre a enolase da bactéria *Haemophilus influenzae* e o plasminogênio humano ocorre mediante ligações de hidrogênio onde participam os resíduos de tirosina, lisina e ácido glutâmico presentes no sítio de união da enolase.

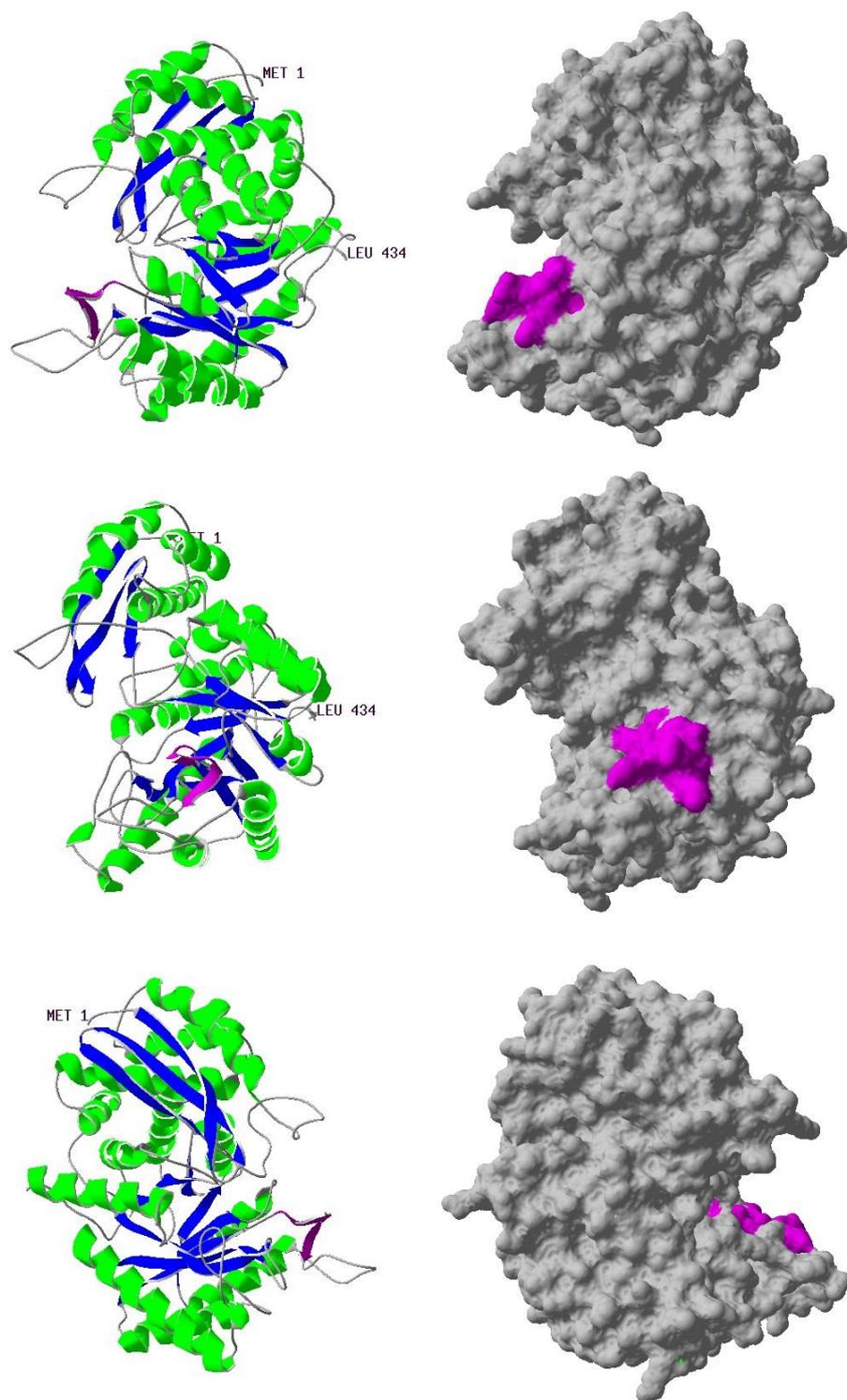


Figura 26. Três vistas diferentes do modelo tridimensional da enolase de 47 kDa de iL3 de *S. venezuelensis* (Uniprot ID: A0A0K0FKU3) em representação tipo *ribbons* (esquerda) mostrando as diferentes estruturas secundárias e em representação tipo *molecular surface* (direita). O modelo mostra o início (MET 1) e o fim (LEU 434) da cadeia polipeptídica e a localização do sítio de união ao plasminogênio (lilás).

4.9. Análise *in silico* das proteínas de domínio CAP

Seis proteínas de domínio CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5 and Pathogenesis-related 1) foram identificadas nos produtos E/S-RPMI (Uniprot ID: A0A0K0G1T0, A0A0K0FXA8, A0A0K0FZR7, A0A0K0FJA1, A0A0K0FX99 e A0A0K0F4S7) e apenas três delas nos produtos E/S-PBS (A0A0K0FJA1, A0A0K0FX99 e A0A0K0F4S7). De todas essas seis proteínas, apenas três tiveram potencial antigênico (A0A0K0G1T0, A0A0K0FXA8, A0A0K0FJA1).

Com exceção da proteína A0A0K0FZR7, todas elas tiveram um peptídeo sinal para ser secretadas ao meio extracelular pela via clássica. No entanto, esta última proteína possui um domínio transmembrana (Figura 27). A análise BLAST entre as seis proteínas CAP mostrou que existe uma pobre identidade entre elas (6,83%), tendo apenas 29 posições idênticas e 41 posições similares de aminoácidos, a maioria delas localizadas dentro do domínio CAP (Figura 27).

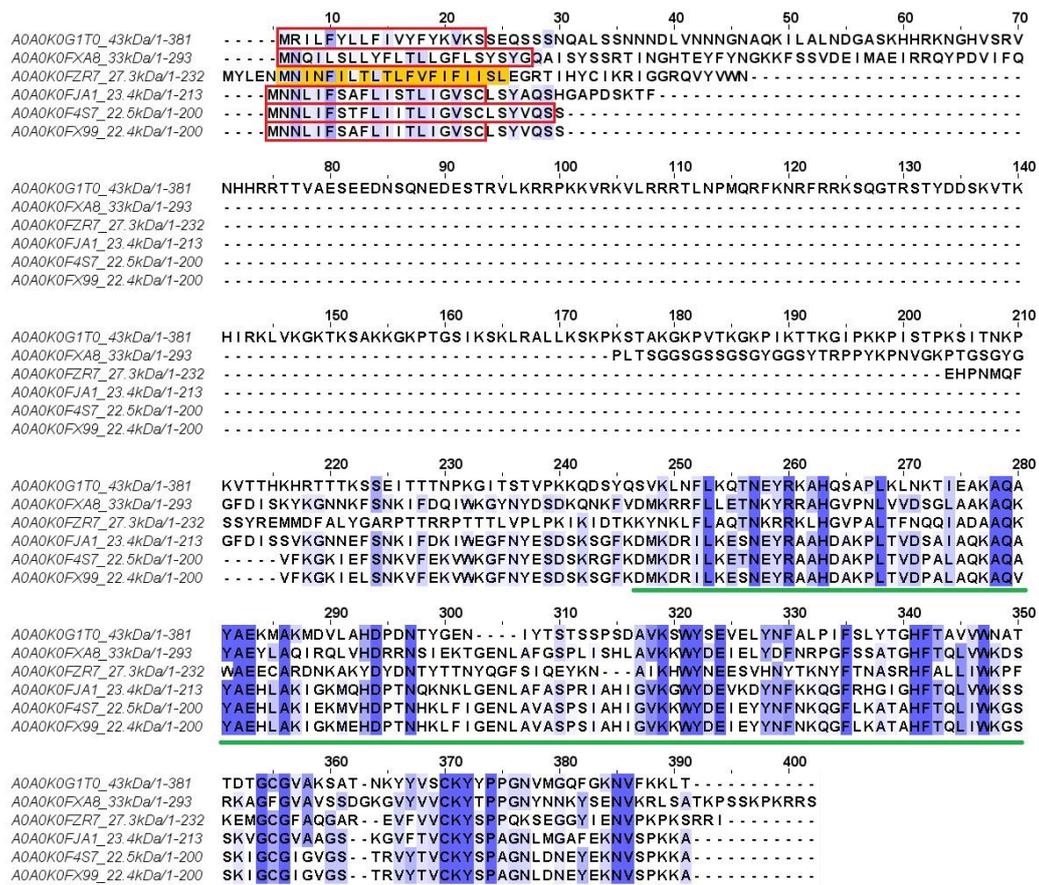


Figura 27. Alinhamento múltiplo das seis proteínas de domínio CAP identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, indicando o peptídeo sinal (quadro vermelho), o domínio transmembrana (quadro amarelo) e o domínio CAP (sublinhado em verde). Cada sequência de proteína possui o código Uniprot, o peso molecular e o número total de aminoácidos.

A análise BLAST da proteína CAP A0A0K0G1T0 mostrou um 64% de identidade com o homólogo de presente em *S. papillosus* (Uniprot ID: A0A0N5BUY7), 47,7% com o homólogo de *S. stercoralis* (A0A0K0DZE9), 46,5% de identidade com o homólogo de *S. ratti* (A0A090LJ45) e 43,9% com o antígeno recombinante NIE (Q9UA16), que vem sendo utilizado com potencial marcador sorológico de infecção por *S. stercoralis* (Ravi et al. 2002). Do mesmo modo, a proteína CAP A0A0K0G1T0 tem 47,5% de identidade com o homólogo presente em *E. vermicularis* (A0A0N4UTA7), 34,7% de identidade com o homólogo presente em *T. canis* (A0A183UHX4) e 34% de identidade com o homólogo presente em *A. lumbricoides* (A0A0M3HW49). Em relação aos homólogos presentes em mamíferos, a proteína CAP A0A0K0G1T0 tem 39,7% de identidade com a proteína relacionada à patogênese associada ao Golgi (GAPR-1) presente no ser humano (Q9H4G4) e no camundongo (Q9CYL5).

Por outro lado, a proteína CAP A0A0K0FXA8 mostrou um 56,4% de identidade com a proteína A0A0K0F4S7, 54,7% com as proteínas A0A0K0FJA1 e A0A0K0FX99 (identificadas no presente estudo) e 44,5% com a proteína A0A0K0G1T0. Do mesmo modo, a proteína em menção tem 69,8% de identidade com o homólogo de presente em *S. papillosus* (A0A0N5BJ55), 58,1% com o homólogo de *S. ratti* (A0A090KZP0), 54,4% com o homólogo de *S. stercoralis* (A0A0K0E6K0) e 50% de identidade com o antígeno recombinante NIE de *S. stercoralis* (Q9UA16). Em relação a outros parasitos, a análise BLAST mostrou que a proteína em menção tem 50% de identidade com o homólogo presente em *E. vermicularis* (A0A0N4UTA7), 35,5% de identidade com o homólogo presente em *A. duodenale* (A0A0C2GEL4) e 34,5% de identidade com os homólogos presentes em *N. americanus* (W2TYL7) e *A. lumbricoides* (A0A0M3ID47). Em relação aos homólogos presentes em mamíferos, a proteína A0A0K0FXA8 tem 45,1% de identidade com a proteína GAPR-1 presente no ser humano (Q9H4G4) e no camundongo (Q9CYL5).

Em relação à proteína CAP A0A0K0FJA1, a análise BLAST mostrou 73,2% com a proteína CAP A0A0K0FX99 e 72,3% com a proteína CAP A0A0K0F4S7 (identificadas também no presente estudo), 84,5% de identidade com o homólogo de presente em *S. papillosus* (A0A0N5BJE1), 55,5% com o homólogo de *S. ratti* (A0A090LJ45), 54,8% de identidade com o homólogo de *S. stercoralis*

(A0A0K0E6K4) e 52,3% com o antígeno recombinante NIE de *S. stercoralis* (Q9UA16). Do mesmo modo, a análise BLAST também mostrou que a proteína em menção tem 55,6% de identidade com o homólogo presente em *E. vermicularis* (A0A0N4UTA7), 35,1% de identidade com o homólogo presente em *N. americanus* (W2T648) e 32,7% de identidade com o homólogo presente em *T. canis* (A0A183TX51). Com respeito aos homólogos presentes em mamíferos, a proteína A0A0K0FXA8 tem 43% de identidade com a proteína GAPR-1 presente no camundongo (Q9CYL5) e 42,4% no ser humano (Q9H4G4).

A Figura 28 mostra a relação de identidade que existe entre as três proteínas CAP com potencial antigênico, anteriormente mencionadas, e seus respectivos homólogos presentes no ser humano e no camundongo.

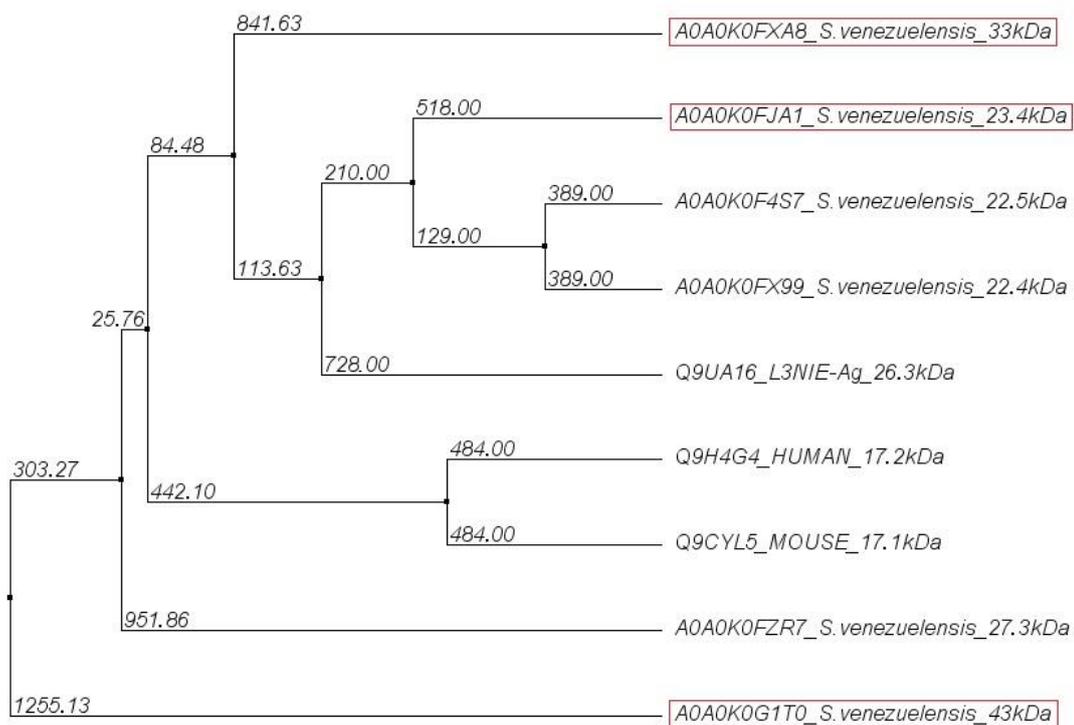


Figura 28. Reconstrução filogenética das seis proteínas de domínio CAP identificadas nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua similaridade com o antígeno recombinante NIE e com a proteína GAPR-1 presente no ser humano (Q9H4G4) e no camundongo (Q9CYL5). As três proteínas CAP potencialmente antigênicas ($AAR \leq 50$) foram enquadradas em vermelho. O fenograma inclui os valores resultantes do algoritmo de distancias médias (Método UPGMA).

Embora o alinhamento múltiplo de sequências completas das proteínas sugira que a proteína A0A0K0FJA1 esteja próxima ao antígeno recombinante NIE, o

alinhamento múltiplo dos domínios CAP das três proteínas em menção mostra que a proteína A0A0K0FXA8 seria mais próxima (59% de identidade: 79 aminoácidos idênticos e 30 aminoácidos similares) do que a proteína A0A0K0FJA1 (50% de identidade: 66 aminoácidos idênticos e 38 aminoácidos similares) (Figura 29).

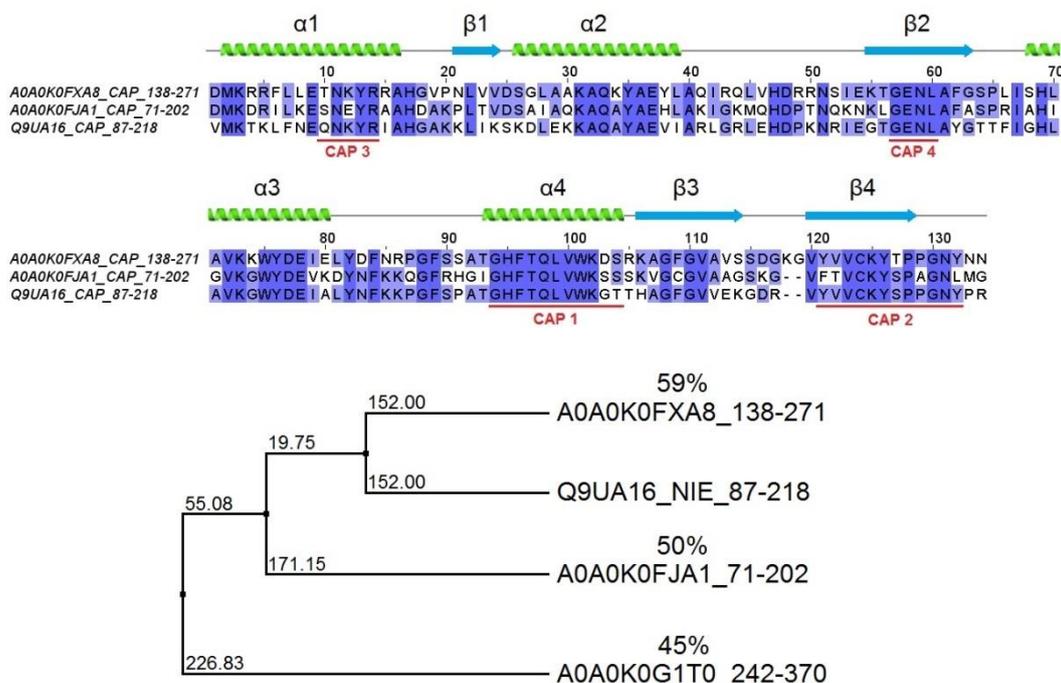


Figura 29. Alinhamento múltiplo do domínio CAP das proteínas A0A0K0FXA8, A0A0K0FJA1 identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua relação de similaridade com o antígeno recombinante NIE. O gráfico superior mostra as regiões conservadas de aminoácidos entre as três proteínas e os quatro subdomínios ou sítios conservados do domínio CAP (CAP1, CAP2, CAP3 e CAP4), bem como a estrutura secundária típica do domínio CAP (cadeias α - β - α). O gráfico inferior mostra a reconstrução filogenética entre os domínios CAP das proteínas A0A0K0FXA8 e A0A0K0FJA1, baseado no grau de identidade com respeito ao antígeno recombinante NIE (expressado em porcentagem). A proteína CAP A0A0K0G1T0 foi incluída como referencia da distancia filogenética.

O domínio CAP constitui uma região conservada entre as diferentes espécies de organismos (vertebrados e invertebrados) que contêm uma sequência exclusiva de estruturas α -hélice-folha- β pregueada- α -hélice (Figura 25). Ademais, existem até quatro subdomínios dentro do domínio CAP, formados por sequências de aminoácidos com a seguinte sequência padrão: CAP1 = [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM][LIVMA]W_{xx}[STN]; CAP2 =

[LIVMFYH][LIVMFY]_xC[NQRHS]Y_x[PARH]_x[GL]N[LIVMFYWDN]; CAP3 = _xN_{xx}R e CAP4 = G[EQ]N[ILV], onde quaisquer dos aminoácidos presentes dentro dos colchetes estará presente na posição determinada da sequência e “x” representa qualquer aminoácido (Gibbs et al. 2008).

Vários autores têm demonstrado que o domínio CAP possui uma região com capacidade de transportar moléculas de esteroide (Kelleher et al. 2014; Gamir et al. 2017; Asojo et al. 2018; Darwiche et al. 2018), como foi demonstrado nas proteínas PRY da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Choudhary et al. 2014; Darwiche et al. 2017), e outra região para transportar ácidos graxos ou capturar leucotrienos como uma possível estratégia de modulação imune, como foi demonstrada na proteína tablysin-15 presente na saliva do inseto hematófago *Tabanus yao* (Xu et al. 2012).

Nesse sentido, uma análise comparativa do domínio CAP entre as cinco proteínas com peptídeo sinal para serem secretadas ao meio externo (A0A0K0G1T0, A0A0K0FXA8, A0A0K0FJA1, A0A0K0FX99 e A0A0K0F4S7) e os domínios CAP da proteína PRY e o tablysin-15 sugere que a região de união a moléculas de esteroide e a região de união a ácidos graxos ou leucotrienos também estaria presente nas proteínas CAP identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* (Figura 30).

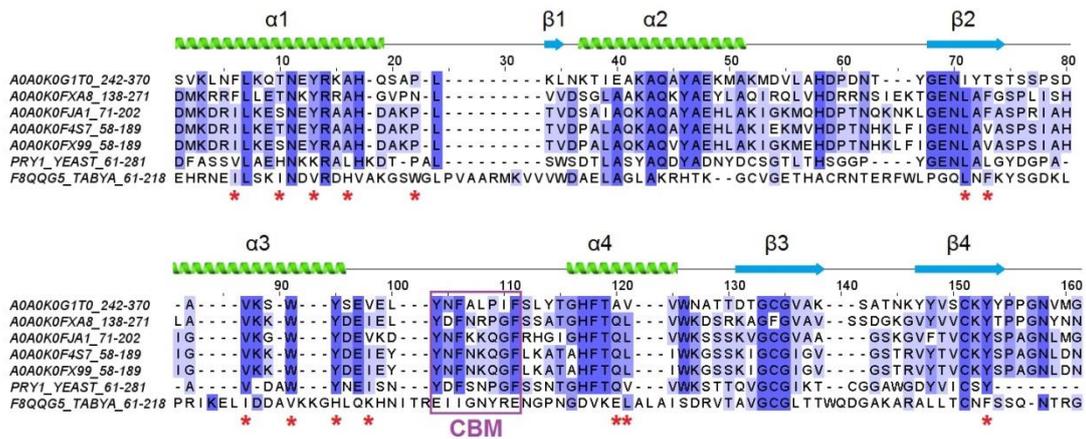


Figura 30. Alinhamento múltiplo dos domínios CAP das proteínas PRY (PRY1_YEAST) e Tablysin-15 (F8QQG5_TABYA) e as cinco proteínas com domínio CAP e com peptídeo sinal, identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. No gráfico pode observar a distribuição de aminoácidos preferencialmente hidrofóbicos (asterisco vermelho) que intervêm na união e captura de ácidos graxos e leucotrienos (Xu et al. 2012). O sítio de união a esteróis (caveolin-binding motif, CBM) se encontra ressaltado com um quadro lilás.

4.9.1. Análise estrutural da proteína CAP A0A0K0FXA8

A proteína CAP A0A0K0FXA8, identificada nos produtos E/S-RPMI de *S. venezuelensis*, possui um peptídeo sinal de 22 aminoácidos seguido de 271 aminoácidos que conformam a proteína madura (30,5 kDa), dos quais apenas 59 aminoácidos formam cadeias α -hélices (21,7%) e 31 aminoácidos formam cadeias folha- β pregueada (11,4%); o restante dos aminoácidos formam cadeias tipo alça simples. O modelo tridimensional da proteína madura mostra que a estrutura secundária da porção N-terminal está formada por 115 aminoácidos (42,43% do total da proteína madura), dos quais o 83,47% (96 aminoácidos) está formado por uma cadeia alça simples e o restante dos aminoácidos formam três pequenas cadeias α -hélices e uma pequena cadeia folha- β pregueada (Figura 31).

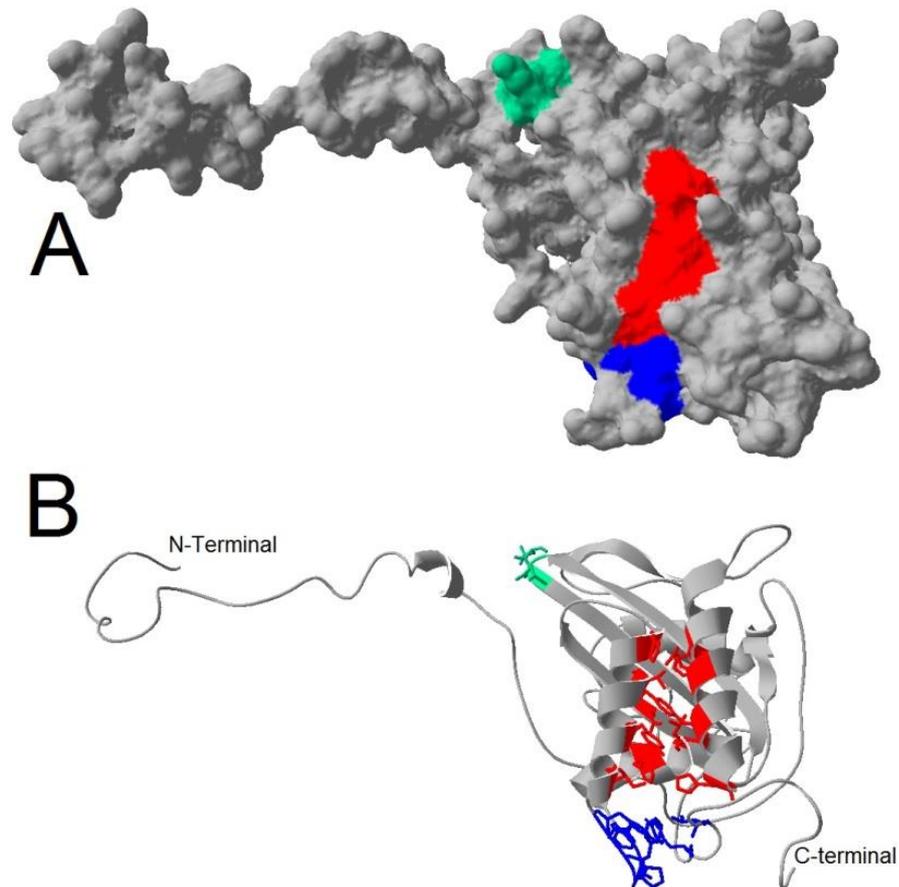


Figura 31. Modelo tridimensional da forma madura da proteína CAP A0A0K0FXA8, identificada nos produtos E/S-RPMI de iL3 de *S. venezuelensis*, em representação tipo *molecular surface* (A) e em representação tipo *ribbons* (B) mostrando as diferentes estruturas secundárias e as porções N-terminal e C-terminal da proteína, a região central de união ou captura de ácidos graxos e leucotrienos (vermelho), uma região de união a esteróis (azul) e a sequência de união à integrina α IIb β 3 “KGD” (verde).

A porção C-terminal da proteína é constituído quase integralmente pelo domínio CAP (cujas estrutura secundária é mostrada em detalhe na Figura 31) que possui quatro cadeias α -hélices e quatro cadeias folha- β pregueada.

Uma análise detalhada da estrutura tridimensional do domínio CAP mostra que a região involucrada na união a ácidos graxos e leucotrienos está constituída preferencialmente por aminoácidos apolares hidrofóbicos situados na primeira, terceira e quarta cadeia α -hélice (Figuras 30), os quais formam uma cavidade para albergar as mencionadas moléculas (Figura 32).

A análise comparativa entre as estruturas tridimensionais da proteína CAP A0A0K0FXA8 e a proteína tablysin-15 do inseto hematófago *Tabanus yao* (PDB: 3U3U) (Xu et al. 2012) sugere que, a proteína CAP de *S. venezuelensis* identificada neste estudo, ainda conserva aminoácidos hidrofóbicos necessários e importantes para o reconhecimento e captura ou de ácidos graxos e leucotrienos.

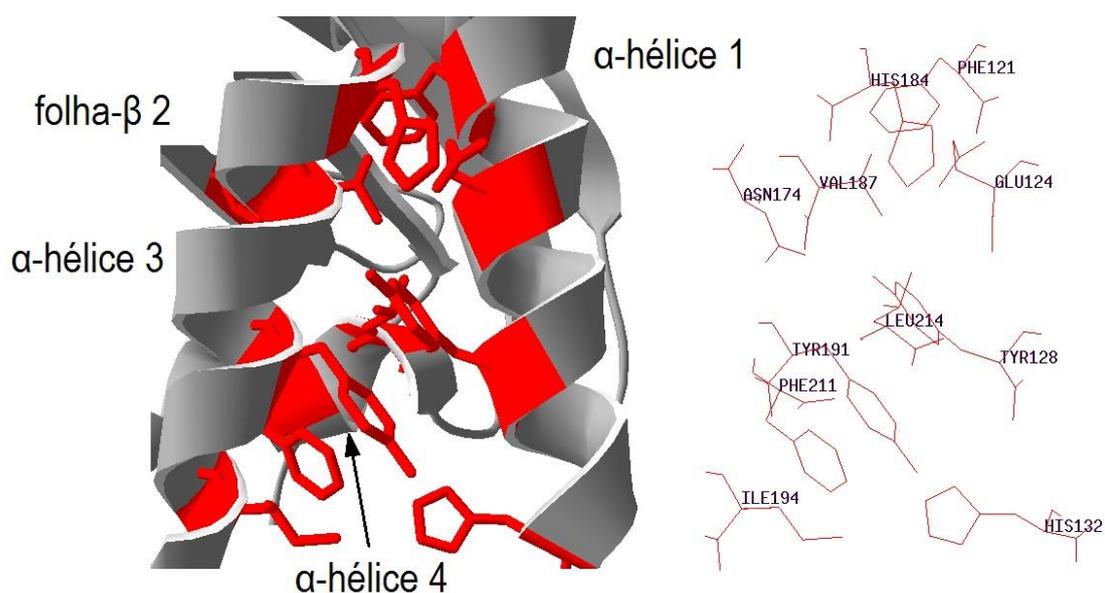


Figura 32. Detalhe da cavidade dentro do domínio CAP da proteína A0A0K0FXA8 (estrutura tipo *ribbons*), formada pelas cadeias α -hélice 1, 3 e 4, onde pode se observar a presença de aminoácidos apolares hidrofóbicos (vermelho) involucrados na captura e união de ácidos graxos e leucotrienos. À direita, estão detalhados quais aminoácidos participam no reconhecimento e união de ácidos graxos e leucotrienos.

Uma análise mais detalhada da sobreposição dos domínios CAP das duas proteínas mencionadas (Figura 33), mostra que a proteína CAP A0A0K0FXA8 possui aminoácidos hidrofóbicos nas mesmas posições das três cadeias α -hélices que

a proteína tablysin-15 utiliza para capturar ácidos graxos e leucotrienos, concluindo assim que a proteína CAP A0A0K0FXA8 tem o potencial para capturar leucotrienos e ser uma proteína involucrada na evasão da resposta imune do hospedeiro.

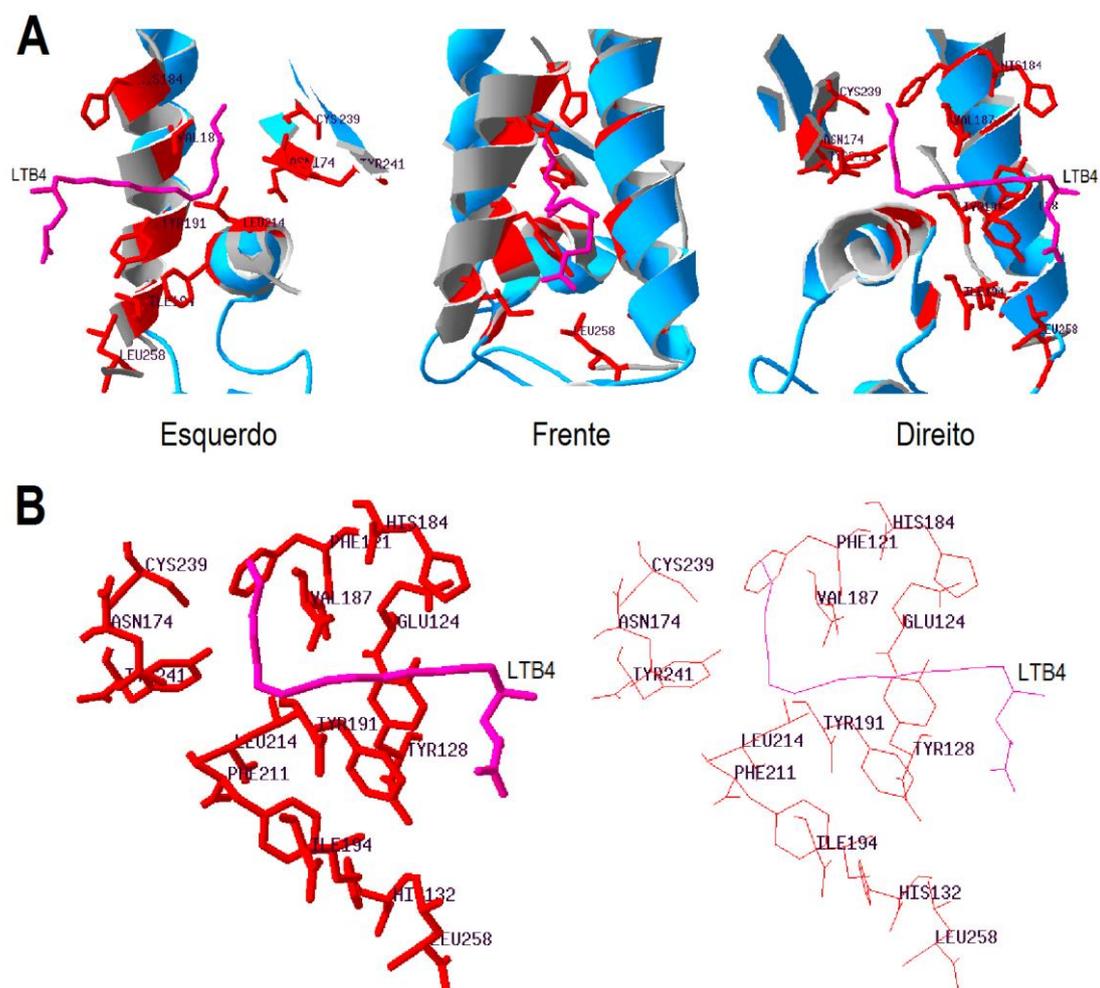


Figura 33. Sobreposição das estruturas tridimensionais dos domínios CAP da proteína tablysin-15 (PDB: 3U3U; celeste) e a proteína A0A0K0FXA8 (cinza) mostrando os aminoácidos hidrofóbicos involucrados no reconhecimento e captura do leucotrieno B4 (LTB4)(lilás). Na imagem superior (A), pode se observar distribuição dos aminoácidos involucrados, em três vistas diferentes (frente, esquerda e direita). Na imagem inferior, se mostra ao detalhe os nomes de todos os aminoácidos involucrados no reconhecimento e captura do leucotrieno.

Por outro lado, a região de união a esteróis se encontra situada entre a terceira e quarta cadeia α -hélice do domínio CAP, constituído por 10 aminoácidos que contêm o sítio de união a caveolina: [FYW] x [FYW]xxxx[FYW], onde quaisquer dos três aminoácidos específicos dentro dos colchetes estarão apenas presentes nas

posições determinadas, e “x” representa qualquer aminoácido (Choudhary et al. 2014) (Figura 30).

A análise da estrutura tridimensional da proteína CAP A0A0K0FXA8 mostra que a região de união a esteróis encontra-se situada na parte inferior e posterior em relação à cavidade de reconhecimento e captura de ácidos graxos e leucotrienos (Figura 34A), formando assim também uma pequena cavidade (Figura 34B). Neste caso, os aminoácidos hidrofóbicos tirosina, fenilalanina e, provavelmente também a prolina, participam ativamente na captura de moléculas de esterol. Ademais, é possível que os aminoácidos tirosina (TYR 251) e valina (VAL 255), presentes no final da porção C-terminal da proteína, também estejam involucrados na captura de esteróis (Figura 34C).

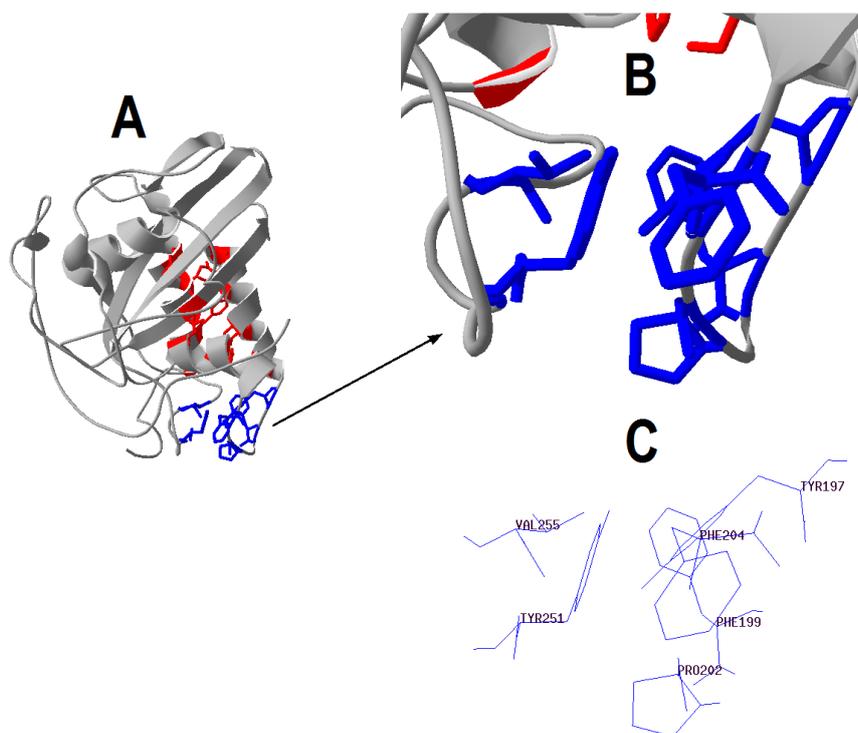


Figura 34. Detalhe da região de união a esteróis presente na proteína CAP A0A0K0FXA8, localizada entre as cadeias α -hélice 3 e 4, na parte inferior e posterior a cavidade de reconhecimento de ácidos graxos e captura de leucotrienos (A), donde pode se observar a presença de aminoácidos hidrofóbicos (azul) que formam parte do sítio de união a esteróis (B). Além disso, é possível que os aminoácidos TYR251 e VAL255, presentes no final da porção C-terminal da proteína, estejam também involucrados na união a esteróis (C).

Resulta interessante destacar que entre a terceira e quarta cadeia folha- β pregueada do domínio CAP da proteína A0A0K0FXA8 existe, em forma invertida, a sequência “KGD” (lisina-glicina-ácido aspártico) da desintegrina barbourin da serpente *Sistrurus miliarius barbouri*, que é capaz de se unir especificamente à integrina α IIb β 3 das plaquetas, inibindo assim a agregação plaquetária (Scarborough et al. 1991).

A análise da estrutura tridimensional da proteína CAP A0A0K0FXA8 mostra que a sequência “KGD” se encontra localizada na parte superior e posterior em relação à cavidade de captura de ácidos graxos e leucotrienos, numa região exposta e livre para reconhecer e se ligar à integrina α IIb β 3 (Figura 35).

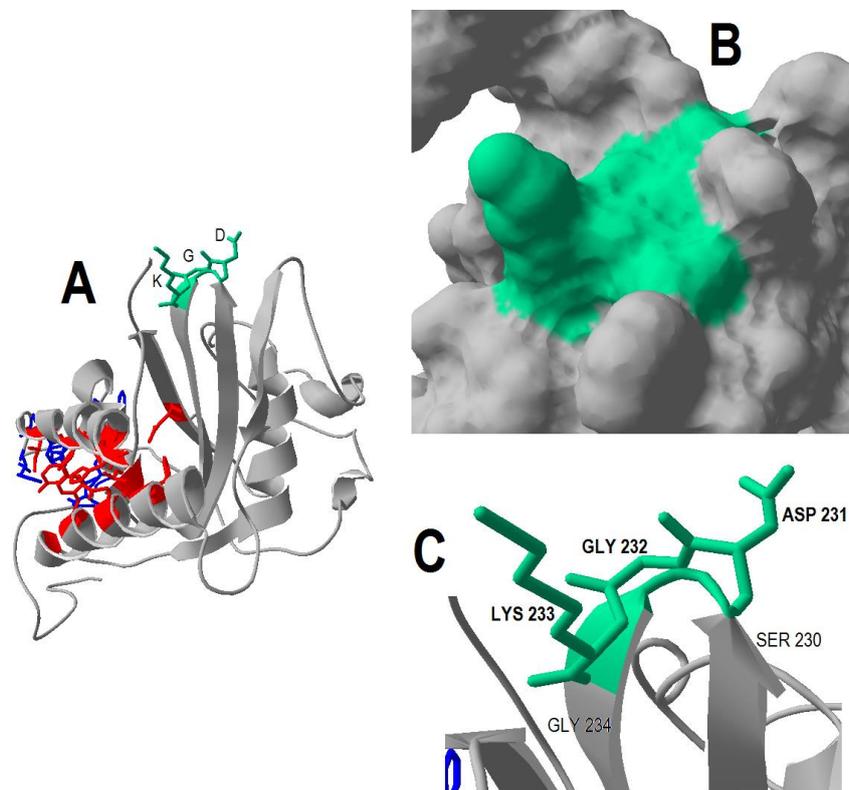


Figura 35. Detalhe da parte superior da estrutura tridimensional (tipo *ribbons*) da proteína CAP A0A0K0FXA8, onde se mostra a localização da sequência “KGD” (A), entre as cadeias folha- β pregueada 3 e 4. A sequência “KGD” se encontra situada numa região exposta e livre (C) para reconhecer e se ligar à integrina α IIb β 3, presente nas plaquetas e inibir agregação plaquetária. A figura também mostra uma representação tridimensional da sequência “KGD” em estilo *molecular surface* (B).

4.10. Análise *in silico* das proteínas 14-3-3 de iL3 de *S. venezuelensis*

As proteínas 14-3-3 pertencem a uma família de proteínas reguladoras de sete isoformas (β , ϵ , γ , η , σ , τ e ζ) altamente conservadas em todas as espécies e podem interagir com muitos alvos intracelulares. As proteínas 14-3-3 podem atuar como dímeros ou heterodímeros e reconhecem resíduos fosforilados de serina/treonina, formando assim parte de um sistema regulatório com quinases e fosfatases.

Duas proteínas 14-3-3 foram identificadas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis*: a proteína A0A0K0FYU3 foi identificada na fracção imunogênica LMW, enquanto que a proteína A0A0K0FYU5 foi identificada na fracção não imunogênica por embaixo da fração LMW.

As proteínas 14-3-3 de *S. venezuelensis* possuem uma estrutura secundária altamente conservada de cadeias α -hélice; a única diferença ressaltante na proteína A0A0K0FYU3 é a presença de duas cadeias α -hélices adicionais (constituídas por um total de 50 aminoácidos) na região C-terminal da proteína, somando assim, um total de 13 cadeias α -hélice (Figura 36).

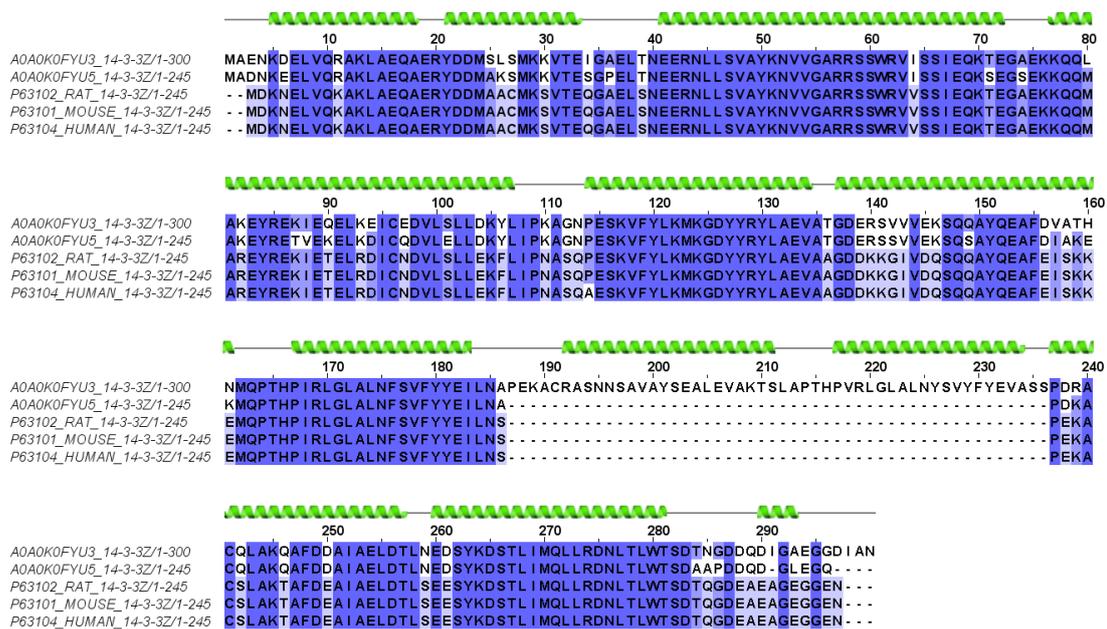


Figura 36. Alinhamento múltiplo das sequências das duas proteínas 14-3-3 identificadas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e sua similaridade com os homólogos presentes no ser humano (P63104), camundongo (P63101) e rato (P63102). A imagem também mostra a estrutura secundária das proteínas 14-3-3, caracterizada por uma predominância de cadeias α -hélice, bem como as regiões altamente conservadas (azul escuro) e medianamente conservadas (azul claro).

O alinhamento múltiplo de sequências das duas proteínas 14-3-3 de *S. venezuelensis* e seus homólogos presentes no ser humano (Uniprot: P63104), camundongo (P63101) e rato (P63102) (Figura 36), sugere que a proteína A0A0K0FYU5 é filogeneticamente mais próxima dos homólogos mencionados (76,1% de identidade), do que a proteína A0A0K0FYU3 (64,3% de identidade) (Figura 37).

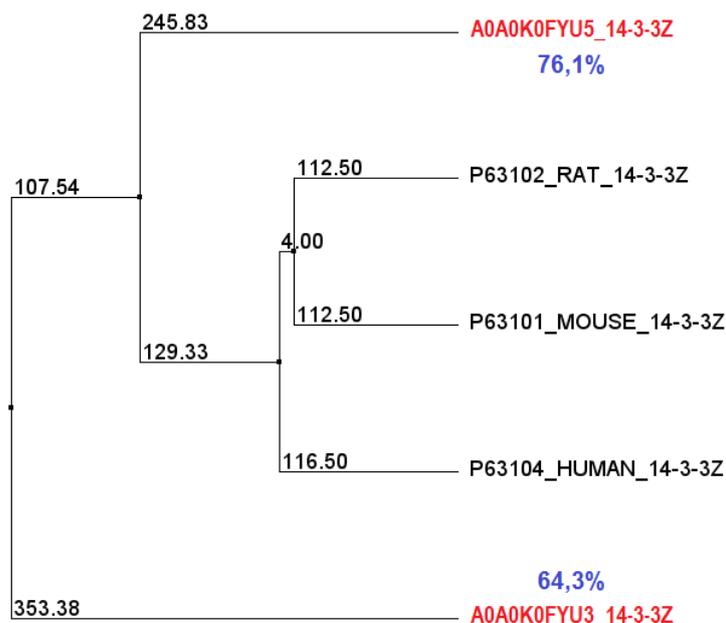


Figura 37. Reconstrução filogenética baseada no alinhamento múltiplo das proteínas 14-3-3 (Figura 32), mostrando que a proteína A0A0K0FYU5 possui maior identidade com seus homólogos presentes no ser humano (Uniprot: P63104), camundongo (Uniprot: P63101) e rato (Uniprot: P63102).

4.10.1. Análise estrutural das proteínas 14-3-3 de iL3 de *S. venezuelensis*

A proteína A0A0K0FYU3 tem um PM de 33,7 kDa e está constituída de 300 aminoácidos, dos quais o 71,6% formam cadeias α -hélice. Por outro lado, a proteína A0A0K0FYU5 tem um PM de 27,9 kDa e está constituída de 245 aminoácidos, dos quais o 78,4% formam cadeias α -hélice, e ambas as proteínas não possuem peptídeo sinal para ser secretadas pela via clássica. No entanto, a análise bioinformática com a ferramenta ExoPred sugere que as proteínas 14-3-3 podem ser liberadas ao meio externo dentro de vesículas extracelulares ou exossomos, como já foi demonstrado por alguns autores (Marcilla et al. 2012; Wang et al. 2013).

O modelo tridimensional das proteínas 14-3-3 de *S. venezuelensis* mostra que a proteína A0A0K0FYU5 possui uma morfologia muito similar quando comparado

com os modelos tridimensionais das proteínas 14-3-3 do ser humano (PDB: 6ZCJ) e do camundongo (PDB: 7EXE). Por outro lado, a proteína A0A0K0FYU3 se destaca pela presença de duas cadeias α -hélice que sobressaem da estrutura, resultando ser menos similar aos homólogos anteriormente mencionados (Figura 38).

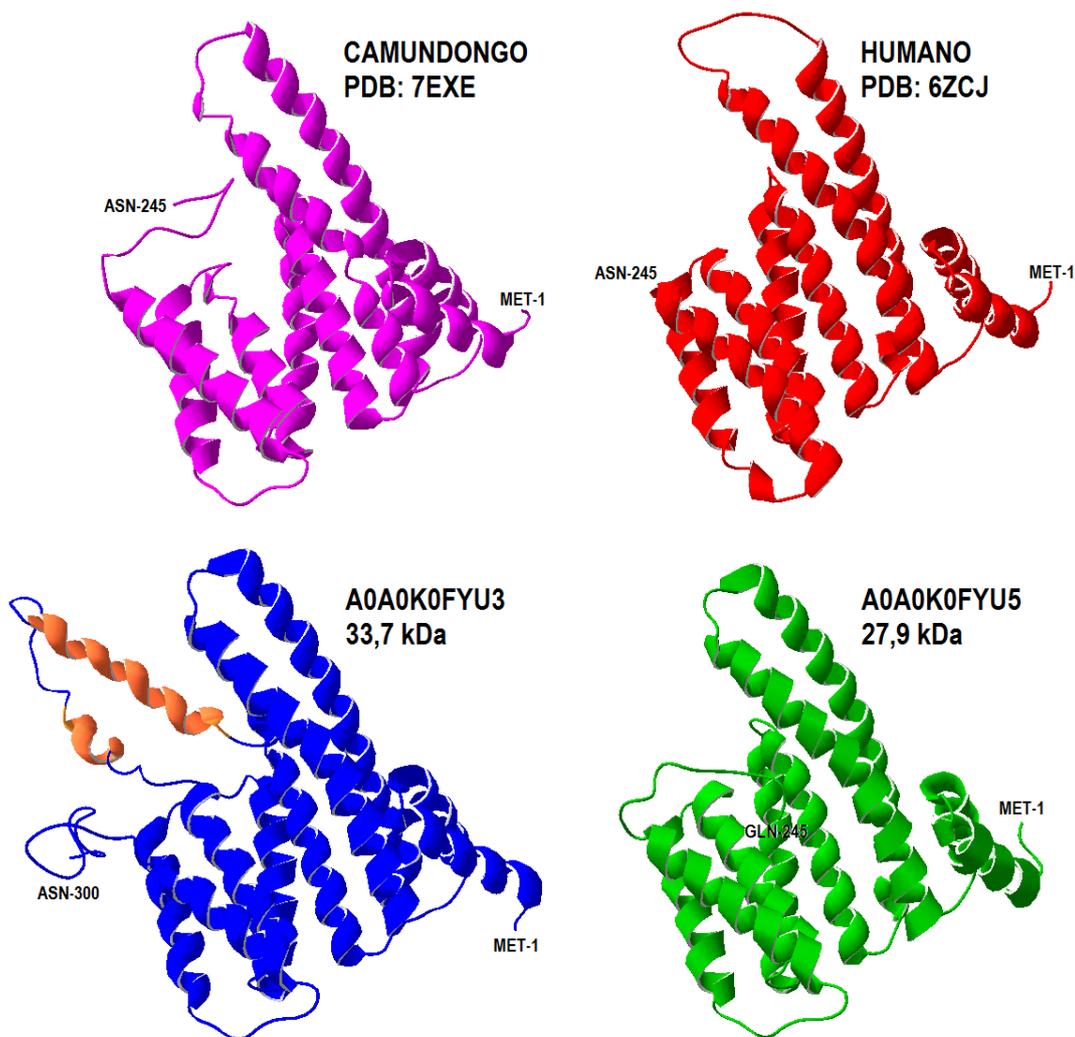


Figura 38. Modelo tridimensional tipo *ribbons* das proteínas 14-3-3 A0A0K0FYU3 e A0A0K0FYU5 identificadas nos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis*. As proteínas 14-3-3 presente no ser humano (PDB: 6ZCJ) e no camundongo (PDB: 7EXE) foram representados, na parte superior da imagem, como referências. A proteína A0A0K0FYU3 possui ao menos duas cadeias α -hélice adicionais (corados em laranja). O modelo tridimensional também mostra o início e o termino da cadeia polipeptídica.

Com o intuito de saber se as duas proteínas 14-3-3 de iL3 de *S. venezuelensis* são funcionalmente ativas dentro do hospedeiro, elas foram comparadas mediante sobreposição com três diferentes modelos de complexos proteicos tridimensionais resultantes de diferentes estudos, onde se demonstra que a proteína 14-3-3 humana reconhece e se une a resíduos fosforilados de proteínas intracelulares relacionadas com a regulação da ativação de linfócitos T e B.

O primer estudo envolve o reconhecimento e união da proteína fosforilada BLNK (B cell linker protein) pela proteína 14-3-3 humana, para iniciar o controle e atenuação da sinalização decorrente do receptor dos linfócitos B (Wang et al. 2012a; Soini et al. 2020). A estrutura resultante deste complexo proteico foi depositada na base de dados do site RCSB com o código PDB: 6YLU e a informação sobre os aminoácidos envolvidos na ligação com o peptídeo derivado da proteína BLNK foi obtida na base de dados do site PDBsum.

A análise de sobreposição entre a proteína 14-3-3 humana e a proteína A0A0K0FYU5 mostra que os oito aminoácidos (Lys-49, Arg-56, Lys-122, Arg-129, Tyr-130, Asn-175, Glu-186 e Asn-226) envolvidos na ligação da proteína BLNK, se encontram distribuídos numa cavidade formada pelas cadeias α -hélice 3, 6, 8 e 11, e estes mesmos aminoácidos estiveram presentes na proteína A0A0K0FYU5, com a única diferença que os dois primeiros aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo avançaram duas posições na sequência (Lys-51, Arg-58). A análise da estrutura tipo *molecular surface* da proteína mostra que o peptídeo de nove aminoácidos derivado da proteína BLNK (Arg-148, Leu-149, Thr-150-Ser-151, pThr-152, Leu-153, Pro-154, Ala-155, Leu-156), se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU5 (Figura 39).

No caso da proteína A0A0K0FYU3, estes mesmos oito aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo também estiveram presentes e posicionados na mesma região das diferentes cadeias α -hélice anteriormente mencionadas. Da mesma forma que na proteína A0A0K0FYU5, os dois primeiros aminoácidos envolvidos na ligação ao peptídeo avançaram duas posições (Lys-51, Arg-58) e os últimos três aminoácidos envolvidos avançaram 50 posições (Asn-225, Glu-232, Asn-276). Ademais, a análise da estrutura tipo *molecular surface* da proteína mostra que o peptídeo derivado da proteína BLNK, também se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU3 (Figura 40).

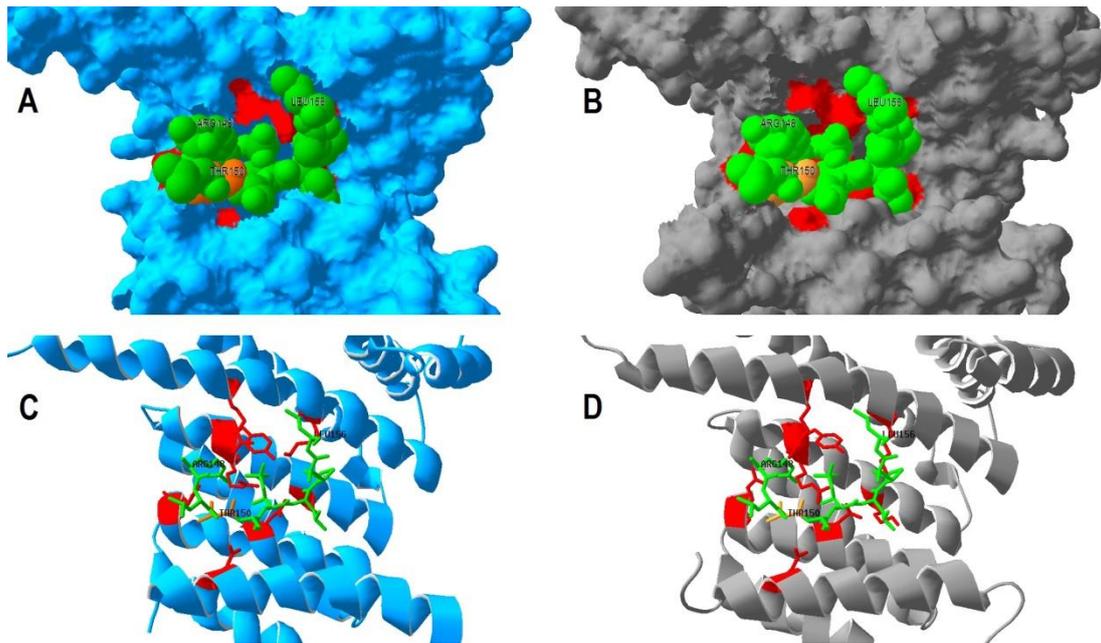


Figura 39. Reconhecimento do peptídeo de nove aminoácidos (verde) contendo uma fosfotreonina (laranja), derivado da proteína BLNK, pela proteína 14-3-3 humana (celeste) e pela proteína A0A0K0FYU5 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

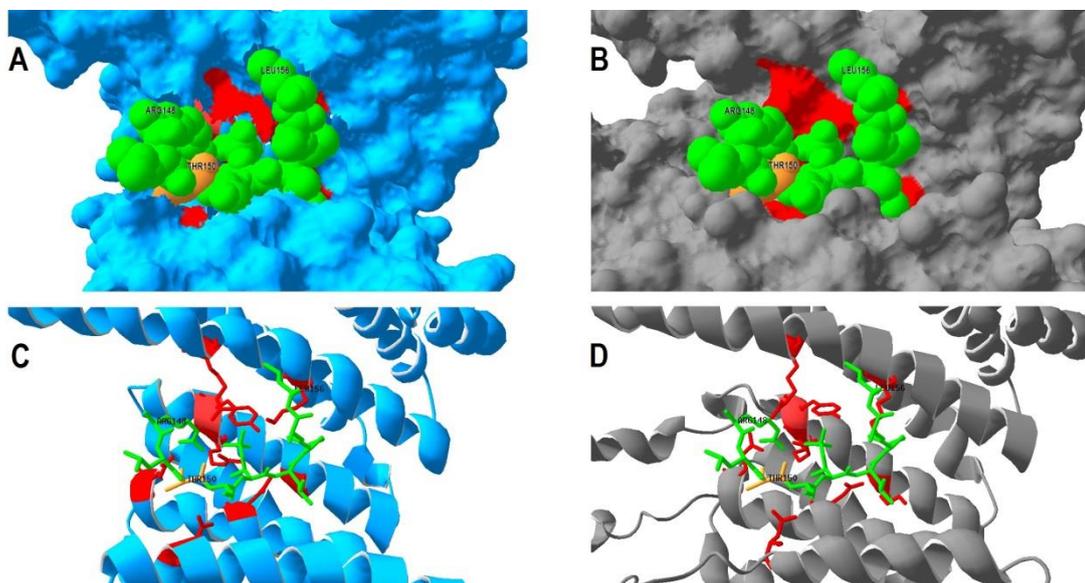


Figura 40. Reconhecimento do peptídeo de nove aminoácidos (verde) contendo uma fosfotreonina (laranja), derivado da proteína BLNK, pela proteína 14-3-3 humana (celeste) e pela proteína A0A0K0FYU3 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

O segundo estudo envolve o reconhecimento e união da proteína I κ B α (inhibitor of nuclear factor kappa B α) pela proteína 14-3-3 humana, para regular a ativação do fator de transcrição NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) durante o desenvolvimento e ativação dos linfócitos B (Wolter et al. 2020). A estrutura resultante deste complexo proteico foi depositada na base de dados do site RCSB com o código PDB: 6Y1J e a informação sobre os aminoácidos envolvidos na ligação com o peptídeo derivado da proteína BLNK foi obtido na base de dados do site PDBsum.

Uma análise de sobreposição entre a proteína 14-3-3 humana e a proteína A0A0K0FYU5 mostra que os seis aminoácidos (Arg-56, Lys-122, Arg-129, Tyr-130, Asn-175 e Asn-226) envolvidos na ligação da proteína I κ B α , se encontram distribuídos na cavidade formada pelas cadeias α -hélice 3, 6, 8 e 11. Estes mesmos aminoácidos também estiveram presentes na proteína A0A0K0FYU5, com a única diferença que o primeiro aminoácido envolvido na ligação do peptídeo avançou duas posições (Arg-58). A análise da estrutura tipo *molecular surface* da proteína mostra que o peptídeo de sete aminoácidos (Gly-62, pSer-63, Glu-64, Pro-65, Trp-66, Lys-67 e Gln-68), derivado da proteína I κ B α , se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU5 (Figura 41).

No caso da proteína A0A0K0FYU3, estes mesmos aminoácidos estiveram presentes e posicionados na mesma região das diferentes cadeias α -hélice anteriormente mencionadas. Da mesma forma que na proteína A0A0K0FYU5, o primeiro aminoácido envolvido na ligação do peptídeo avançou duas posições na sequência (Arg-58) e os últimos dois aminoácidos envolvidos na ligação ao peptídeo avançaram 50 posições (Asn-225, Asn-276). A análise da estrutura tipo *molecular surface* mostra que o peptídeo de sete aminoácidos, derivado da proteína I κ B α , também se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU3 (Figura 42).

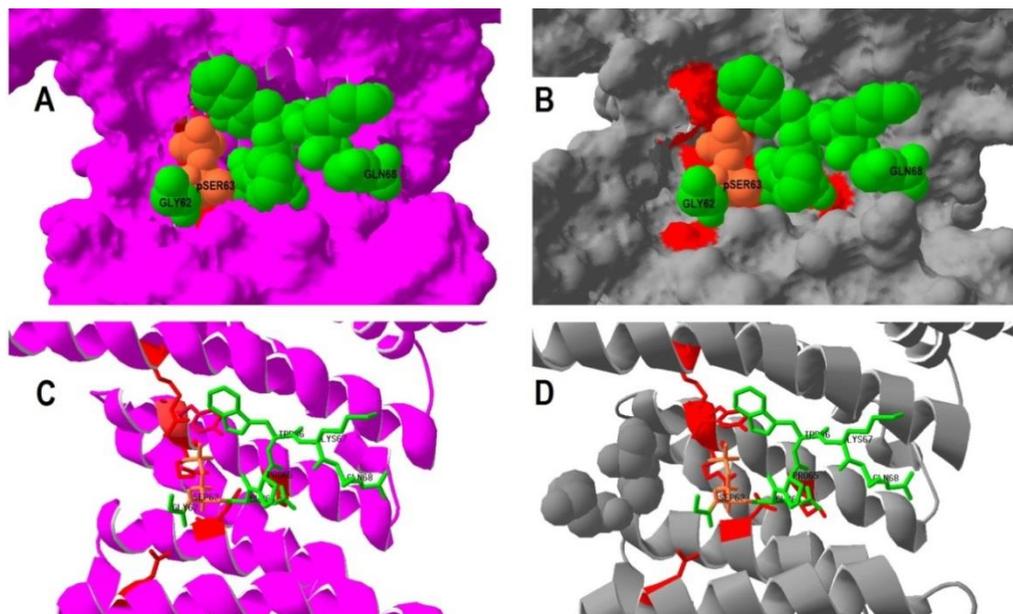


Figura 41. Reconhecimento do peptídeo de sete aminoácidos (verde) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, pela proteína 14-3-3 humana (lilás) e pela proteína A0A0K0FYU5 de *iL3* de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

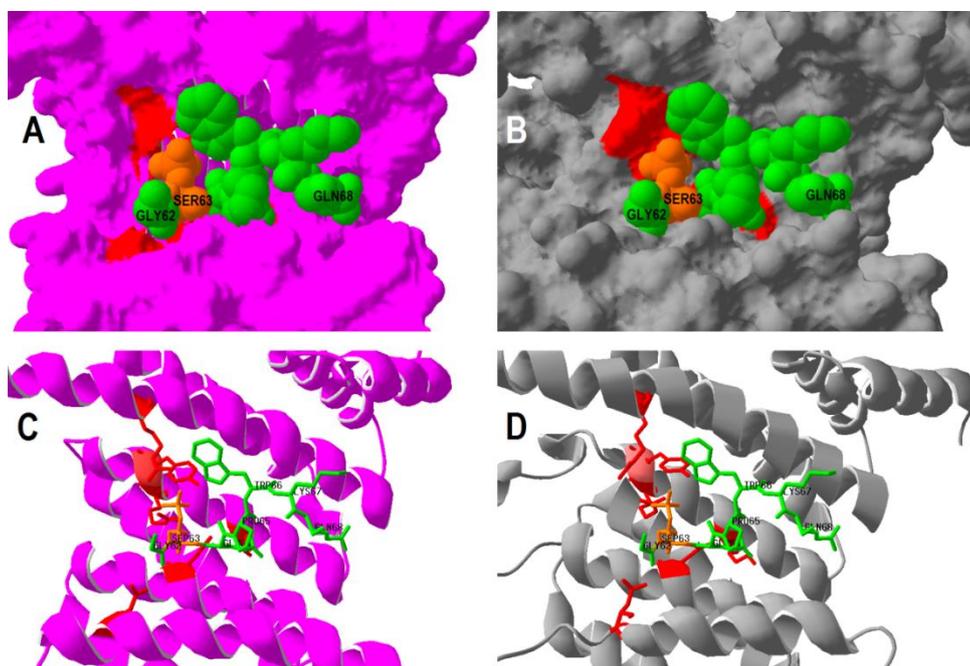


Figura 42. Reconhecimento do peptídeo de sete aminoácidos (verde) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, pela proteína 14-3-3 humana (lilás) e pela proteína A0A0K0FYU3 de *iL3* de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

O terceiro estudo envolve o reconhecimento e união da proteína fosforilada SLP76 (SH2 domain-containing protein of 76 kDa) pela proteína 14-3-3 humana, para sua posterior degradação proteossomal e assim regular em forma negativa e atenuar a ativação dos linfócitos T (Di Bartolo et al. 2007; Shui et al. 2007; Wang et al. 2012b; Soini et al. 2021). Neste caso, a proteína 14-3-3 humana reconhece o resíduo serina 376 que foi fosforilado pela proteína HPK1 (Hematopoietic progenitor kinase 1). A estrutura resultante deste complexo proteico foi depositada na base de dados do site RCSB com o código PDB: 6ZCJ e a informação sobre os aminoácidos envolvidos na ligação com o peptídeo derivado da proteína SLP76 foi obtido na base de dados do site PDBsum.

Uma análise de sobreposição entre a proteína 14-3-3 humana e a proteína A0A0K0FYU5 mostra que os sete aminoácidos (Arg-56, Arg-129, Tyr-130, Asn-175, Asn-226 e Trp-230) envolvidos na ligação da proteína SLP76 pela proteína 14-3-3 humana se encontram distribuídos na cavidade formada pelas cadeias α -hélice 3, 6, 8 e 11. Estes mesmos aminoácidos também estiveram presentes na proteína A0A0K0FYU5, com a única diferença que o primeiro aminoácido envolvido na ligação do peptídeo avançou duas posições na sequência (Arg-58). A análise da estrutura tipo *molecular surface* mostra que o peptídeo de dez aminoácidos (Phe-371, Pro-372, Gln-373, Ser-374, Ala-375-pSer-376, Leu-377, Pro-378, Pro-379 e Tyr-380), derivado da proteína SLP76, se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU5 (Figura 43).

No caso da proteína A0A0K0FYU3, estes mesmos sete aminoácidos também estiveram presentes e posicionados na mesma região das diferentes cadeias α -hélice anteriormente mencionadas. Da mesma forma que na proteína A0A0K0FYU5, o primeiro aminoácido envolvido na ligação do peptídeo avançou duas posições na sequência (Arg-58) e os últimos quatro aminoácidos envolvidos na ligação ao peptídeo avançaram 50 posições (Asn-225, Glu-232, Asn-276, Trp-280). A análise da estrutura tipo *molecular surface* mostra que o peptídeo de sete aminoácidos, derivado da proteína SLP76, também se encaixa perfeitamente na cavidade da proteína A0A0K0FYU3 (Figura 44).

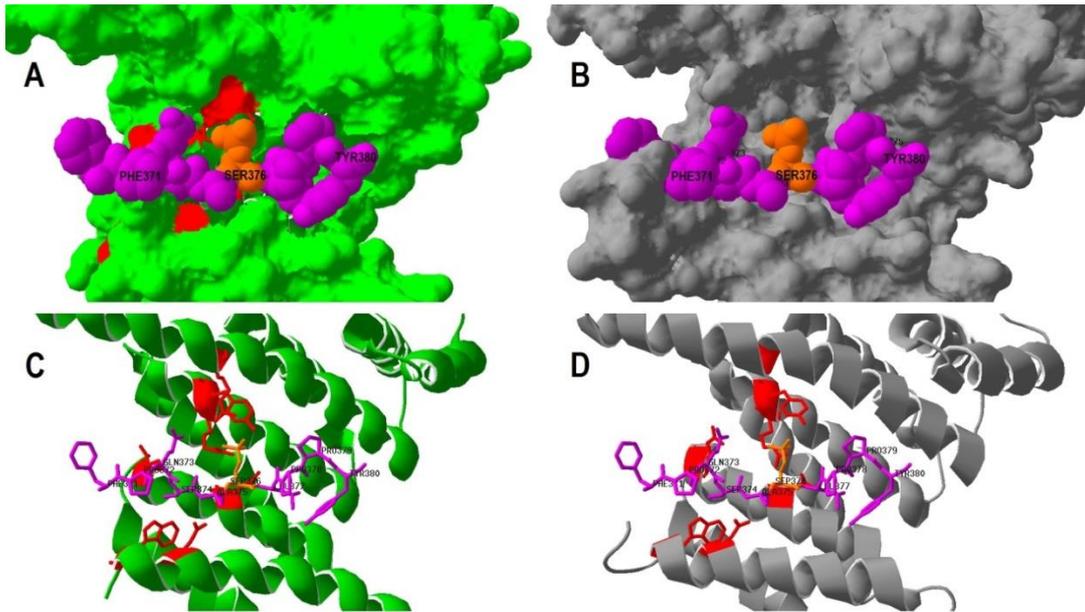


Figura 43. Reconhecimento do peptídeo de dez aminoácidos (lilás) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína SLP76, pela proteína 14-3-3 humana (verde) e pela proteína A0A0K0FYU5 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

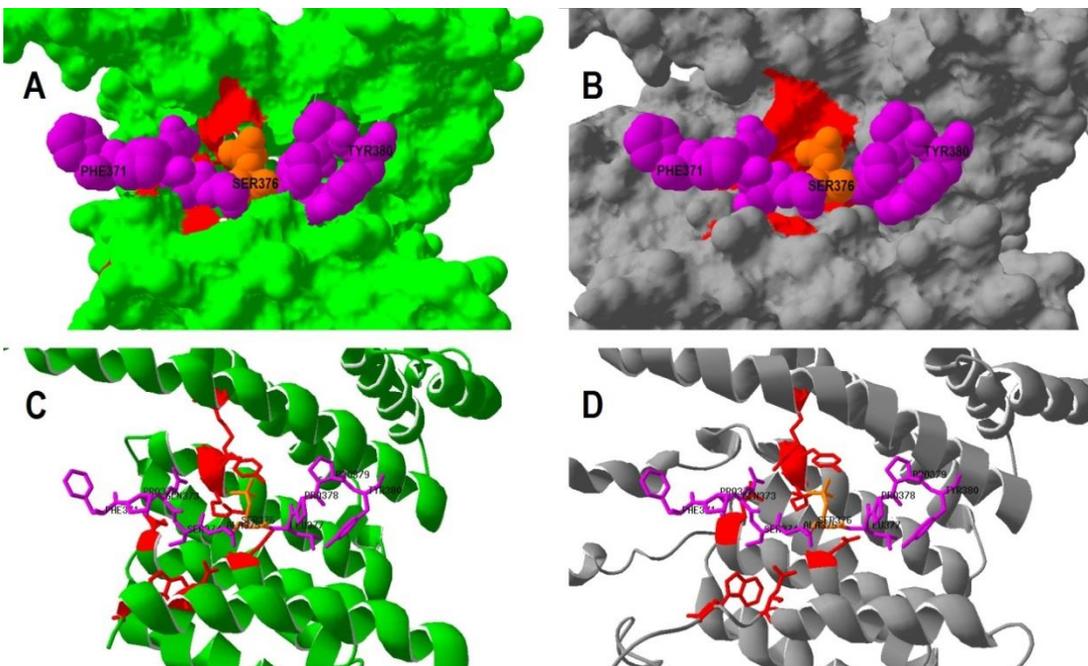


Figura 44. Reconhecimento do peptídeo de dez aminoácidos (lilás) contendo uma fosfoserina (laranja), derivado da proteína SLP76, pela proteína 14-3-3 humana (verde) e pela proteína A0A0K0FYU3 de iL3 de *S. venezuelensis* (cinza). O reconhecimento do peptídeo é mostrado tanto no modelo estrutural tipo *molecular surface* (A e B), quanto no modelo estrutural tipo *ribbons* (C e D). Os aminoácidos envolvidos na ligação do peptídeo foram ressaltados em vermelho.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que vários componentes dos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* foram reconhecidos por anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com estrogiloidíase humana, mas também pelo soro de indivíduos com outras infecções helmínticas e indivíduos saudáveis. De modo geral, as bandas antigênicas das frações LMW e HMW foram mais específicas do que as bandas da fração IMW, que foram menos específicas devido à reatividade cruzada.

Brindley et al. (1988) foram os primeiros a caracterizar os produtos de E/S de iL3 de *S. stercoralis* mediante SDS-PAGE e imunoprecipitação, encontrando mais de 30 bandas proteicas e 12 bandas antigênicas (12, 25, 30, 33, 35, 40, 50, 54, 60, 66, 90 e 240 kDa); é interessante ressaltar que a maioria das bandas antigênicas relatadas por eles concordaram com o PM das bandas antigênicas de produtos E/S de iL3 *S. venezuelensis* encontradas neste estudo, em particular aquelas das frações LMW e IMW.

Por outro lado, Cunha et al. (2017) identificaram 12 bandas proteicas (6, 12, 15, 18, 25, 33, 39, 44, 55, 62, 90 e 240 kDa) nos produtos de E/S de iL3 *S. venezuelensis* coletados em PBS, enquanto que apenas 11 bandas proteicas (6, 12, 15, 18, 25, 33, 39, 44, 48, 55 e 62 kDa) foram identificados nos produtos de E/S coletados em meio RPMI após incubação das iL3 por 72 horas. No presente estudo, foram encontradas 20 e 21 bandas proteicas nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* após incubação durante 24 horas em PBS ou meio RPMI 1640, respectivamente. Diferenças na metodologia de obtenção dos produtos de E/S podem ter influenciado na quantidade e qualidade dos produtos de E/S, já que esses autores obtiveram produtos de E/S com baixa concentração proteica e menor número de bandas proteicas visualizadas após coloração com nitrato de prata.

Por outro lado, a zimografia permitiu evidenciar que os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* contêm ao menos 5 bandas proteicas com atividade serinoprotease (29,7, 32,3, 36,6, 47 e 57,6 kDa) e 3 bandas com atividade metaloprotease (29,7, 41 e 53,5 kDa). Nesse sentido, Brindley et al. (1995) verificaram que as iL3 de *S. stercoralis* liberam uma metaloprotease de 42 kDa nos produtos de E/S. Da mesma forma, Maruyama et al. (2006) reportaram a presença de uma metaloprotease de 42 kDa na iL3 de *S. venezuelensis*. A presença de uma metaloprotease de 41 kDa encontrada nos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis*, coincide com os achados dos autores anteriormente mencionados. Por

outro lado, Soblik et al. (2011) reportaram que as iL3 de *S. ratti* liberam serinoproteases, aspartilproteases e metaloproteases após análise dos produtos de E/S de através de espectrometria de massas. No presente estudo, foram encontradas várias bandas proteicas com atividade serinoprotease que ainda não foram descritos em iL3 de *S. venezuelensis*.

De um modo geral, os produtos E/S-RPMI e E/S-PBS contêm proteínas imunogênicas que são capazes de reagir com os anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com estrogiloidíase, com 100% de sensibilidade e 97,8% de especificidade (tendo em conta apenas quatro casos de reatividade cruzada em indivíduos com outras helmintíases) mediante o teste de ELISA. Estes valores foram superiores aos valores obtidos por Cunha et al. (2017) (95% de sensibilidade e 96,7% de especificidade) e aos valores obtidos por Rokni e Kia (2005) (88,2% de sensibilidade e 86,2% de especificidade). Diferenças no desempenho e acurácia diagnóstica podem ser decorrentes do número e tipo de amostras de soro utilizadas para avaliar esses antígenos, bem como das variações no procedimento para a obtenção dos produtos E/S, tais como o número de parasitos utilizados, tempo de incubação e o volume do meio utilizado para manutenção *in vitro* das larvas, o que pode afetar na qualidade do produto antigênico final.

Vários estudos sobre padronização e avaliação de imunoenaios para o sorodiagnóstico de doenças infecciosas, incluindo estrogiloidíase, geralmente utilizam apenas soros de indivíduos saudáveis para calcular a especificidade diagnóstica e não incluem soros de pacientes com outras infecções parasitárias (Feliciano et al. 2010; Gonçalves et al. 2012). Os resultados do presente estudo sugerem a importância da inclusão de indivíduos infectados com outras parasitoses para determinar um *cut-off* mais adequado para o imunoenai, sobretudo quando o estudo é realizado em áreas endêmicas de parasitoses, como são os diferentes países de América latina, incluindo o Brasil.

Um total de 16 bandas antigênicas foram identificadas nos produtos E/S-RPMI e 15 bandas antigênicas nos produtos E/S-PBS pelo WB, e estas foram agrupadas em três principais frações de acordo com seu PM: LMW, IMW e HMW. Entre os diferentes componentes da fração LMW, a banda antigênica de 36 kDa resultou ter uma sensibilidade de 93% e especificidade de 100% e sem evidência de reatividade cruzada no grupo de pacientes com outras helmintíases. Esta banda

antigênica coincide com uma isoforma de arginina quinase de 37 kDa (Uniprot ID: A0A0K0EZR7) que não possui sites de glicosilação e tem um alto potencial antigênico (AAR = 38,9). De fato, três isoformas de arginina quinase foram identificadas nos produtos E/S-PBS de *S. venezuelensis*, com uma predominância da arginina quinase de 37 kDa.

A arginina quinase é uma enzima que catalisa a fosforilação de resíduos de arginina e está envolvida na homeostase energética em uma ampla gama de espécies de invertebrados. Dentre os helmintos, apenas os nematódeos possuem arginina quinase enquanto que cestóides e trematódeos não possuem esta enzima, embora outros tipos de fosfotransferases possam estar presentes nestes organismos (Barrett 2009).

O estudo detalhado da arginina quinase de 37 kDa de *S. venezuelensis* mostra que a enzima possui vários epítomos específicos do gênero *Strongyloides* que curiosamente se encontram situados na superfície da proteína. Esta característica torna a arginina quinase de 37 kDa como um potencial candidato para o desenvolvimento e produção de uma proteína recombinante (ou peptídeos sintéticos) para o sorodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Alguns autores têm avaliado o potencial diagnóstico da forma recombinante da arginina quinase de *Toxocara canis* como possível marcador diagnóstico da toxocaríase humana apresentando 100% de sensibilidade, porém com reatividade cruzada em indivíduos infectados com *Toxoplasma gondii*, *Echinococcus granulosus* e *Entamoeba histolytica* (Varghese et al. 2017). Atualmente, não há estudos sobre o potencial diagnóstico da arginina quinase para o sorodiagnóstico de estrogiloidíase.

A banda antigênica de 47 kDa identificada pelo WB apresentou um 97% de sensibilidade, mas ocorreu reatividade cruzada em soros de pacientes infectados com *A. lumbricoides* e *H. nana*. De fato, cerca de 30% dos soros de pacientes infectados com *H. nana* reagiram com a maioria dos componentes antigênicos da fração LMW. Esta banda antigênica coincide com uma 2-fosfo-D-glicerato hidro-liase, também conhecida como enolase de 47,2 kDa (Uniprot ID: A0A0K0FKU3) que não possui sítios de glicosilação e também resultou ser potencialmente antigênica (AAR = 31,1). A enolase é uma enzima que pertence à via da glicólise e está envolvida na síntese do piruvato. Apesar de ser conhecida há muito tempo como uma proteína citosólica, a enolase tem sido encontrada na superfície de uma variedade de organismos

patógenos, incluindo helmintos parasitos e possui um alto potencial diagnóstico (Gao et al. 2016; Ponce et al. 2018).

A banda antigênica de 60 kDa da fração IMW foi a mais inespecífica de todas as bandas antigênicas dos produtos E/S de *S. venezuelensis*, reagindo com 72% dos soros de indivíduos saudáveis e com 43% dos soros de pacientes com outras helmintíases. Esta banda antigênica coincide com uma glicose-6-fosfato isomerase de 62,2 kDa (Uniprot ID: A0A0K0G292) que não é glicosilada e foi identificada em ambos os tipos de produtos E/S. Esta enzima metabólica já foi encontrada tanto na superfície quanto nos produtos E/S de diferentes helmintos e parece estar envolvida na modulação da relação parasito-hospedeiro (Stadelmann et al. 2010; Diosdado et al. 2020).

Outro componente inespecífico e com reatividade cruzada foi a banda antigênica de 55 kDa, que coincide a uma isoforma da actina de 55,7 kDa (Uniprot ID: A0A0K0F6C3; AAR = 37,1) A actina é uma proteína estrutural envolvida em muitas funções celulares importantes relacionadas à motilidade, divisão, sinalização, mas também parece atuar como uma proteína de ligação ao plasminogênio (González-Miguel et al. 2016). No entanto, esta isoforma de actina curiosamente não possui sítios de glicosilação e foi classificada pela ferramenta Exopred como uma proteína relacionada a vesículas extracelulares ou exossomos. Vários autores tem descrito a presença de actina como componente estrutural de vesículas extracelulares ou exossomos de helmintos parasitos e de células do hospedeiro (Cwiklinski et al. 2015; Jeppesen et al. 2019).

Em relação aos componentes proteicos da fração HMW, a banda antigênica de 224 kDa foi altamente sensível (83,9%) e não reagiu com soros de indivíduos saudáveis. No entanto, houve reatividade cruzada com soros de pacientes infectados com trematódeos. Infelizmente, o PM calculado para esta banda antigênica não coincide com nenhuma das proteínas identificadas por espectrometria de massas. No entanto, esta banda poderia ser uma serina/treonina quinase não específica com um núcleo proteico de 208 kDa (Uniprot ID: A0A0K0EXN8) e possui vários sítios de glicosilação; ou também poderia ser uma proteína não caracterizada de 220 kDa (Uniprot ID: A0A0K0F3W6) que também possui sítios de glicosilação, e ambas as proteínas são potencialmente antigênicas (AAR = 39,2 e 47,4, respectivamente).

Da mesma forma, a banda antigênica de 105-115 kDa também foi sensível e sem reatividade com os soros de indivíduos saudáveis, mas apresentou reação cruzada principalmente com soros de pacientes com neurocisticercose. Entre as proteínas identificadas que podem corresponder à banda antigênica de 105-115 kDa estão duas proteínas do tipo peroxidase de 107 kDa (Uniprot ID: A0A0K0FL11; AAR = 48,4) e 115 kDa (Uniprot ID: A0A0K0F465; AAR = 37,54) identificadas apenas nos produtos E/S-RPMI ou a calsynenin-1 de 111 kDa (Uniprot ID: A0A0K0F0E3; AAR = 40,1), identificada em ambos os tipos de produtos E/S.

Em relação à banda antigênica de 179 kDa presente apenas nos produtos E/S-RPMI, uma proteína não caracterizada de 169 kDa (Uniprot ID: A0A0K0FZN1; AAR = 36,64) que é altamente O-glicosilada, poderia corresponder a essa banda antigênica. É importante mencionar que o PM previsto de várias proteínas identificadas mediante a espectrometria de massas corresponde apenas ao núcleo proteico e não inclui o PM adicional correspondente às modificações pós traducionais, uma vez que 68,2% e 70,4% das proteínas identificadas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, respectivamente, possuem vários sítios de glicosilação.

Os produtos de E/S, obtidos após incubação de iL3 de *S. venezuelensis* em meio RPMI ou em PBS, apresentaram perfis antigênicos aparentemente semelhantes segundo os resultados de WB. No entanto, a análise de espectrometria de massas revelou que existem diferenças consideráveis entre os perfis de proteínas dos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, uma vez que apenas um terço de todas as proteínas identificadas esteve presente em ambos os tipos de produtos de E/S. Uma possível explicação para esse fenômeno é que o meio RPMI 1640 (rico em aminoácidos, glicose, vitaminas e minerais) pode simular melhor as condições do ambiente do hospedeiro em comparação ao PBS, que é uma solução tampão que apenas simula o pH fisiológico do hospedeiro.

Usando condições de incubação semelhantes a 37°C, Maeda et al. (2019) observaram uma alta taxa de mortalidade e baixo rendimento na produção de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* após 12 horas de incubação em PBS, enquanto que o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foi capaz de estimular muito mais a produção de produtos de E/S. Brindley et al. (1988) observaram que as iL3 de *S. stercoralis* foram capazes de incorporar aminoácidos ou glicose do meio DMEM a 33°C, demonstrando assim que o parasito pode ser

metabolicamente ativo *in vitro*. Da mesma forma, Tsuji et al. (1997) também observaram que as iL3 de *S. venezuelensis* foram capazes de incorporar [³⁵S]-metionina do meio de cultura e sintetizar proteínas como resultado da mudança de temperatura durante a transformação *in vitro* para o estágio parasitário. Essas diferenças ambientais podem alterar o perfil proteico que as iL3 de *S. venezuelensis* secretam *in vitro*.

Em relação à identificação de proteínas feita através da espectrometria de massas, uma limitação no presente estudo é que análise foi feita a partir de amostras separadas em gel poliacrilamida e coradas com nitrato de prata. Diversos autores têm descrito que a coloração com prata pode dificultar a digestão das proteínas pela tripsina, quanto à recuperação dos peptídeos resultantes, fato que pode ser observado no número final de proteínas identificadas, quando comparado com o estudo feito por Maeda et al. (2019), que conseguiram identificar um total de 350 proteínas no secretoma de iL3 de *S. venezuelensis*, com presença de proteínas de domínio CAP, metaloproteases, proteínas associadas ao proteassoma, enzimas metabólicas associadas à via glicolítica, proteínas estruturais, entre outras. Por outro lado, Soblik et al. (2011) identificaram um total de 196 proteínas no secretoma de iL3 de *S. ratti* com presença de proteínas de domínio CAP, enzimas metabólicas, metaloproteases e outras peptidases, proteínas associadas ao proteassoma, proteínas estruturais, entre outras.

No presente estudo, foram identificados um total de 71 e 62 proteínas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, respectivamente, com predominância de proteínas de domínio CAP, proteínas de sinalização 14-3-3, enzimas metabólicas da via glicolítica (malato desidrogenase, fructosa-bifosfato aldolase, enolase), arginina kinases, proteínas estruturais (isoformas de actina), entre outros.

A manipulação da resposta imune do hospedeiro pelos helmintos parasitos é devida principalmente à liberação de produtos E/S que possuem propriedades imunomoduladoras, tais como supressão da resposta inflamatória, modulação de células apresentadoras de antígenos e indução de células T reguladoras (Maizels et al. 2018). No entanto, há evidências crescentes de que os helmintos liberam uma grande variedade de proteínas e microRNAs com funções específicas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos, provavelmente como uma estratégia para

moldar seu ambiente imediato e modular a imunidade do hospedeiro (Drurey et al. 2021).

Nossos resultados sugerem que mais de 50% das proteínas identificadas em ambos os tipos de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* são secretadas através de vesículas extracelulares e apenas uma pequena porcentagem delas realmente é liberada pela via secretora clássica. Nesse sentido, Marcilla et al. (2012) reportaram que mais de 50% das proteínas que compõem os produtos de E/S de *Echinostoma caproni* e *Fasciola hepática*, são realmente secretadas dentro de vesículas extracelulares.

As proteínas identificadas nas três frações antigênicas de ambos os tipos de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* incluem enzimas metabólicas, peptidases, proteínas relacionadas a processos biossintéticos e de sinalização, proteínas do citoesqueleto, proteínas nucleares, proteínas de ligação a íons metálicos, e muitas delas foram também identificadas em vesículas extracelulares de outros helmintos, tais como *Ascaris suum* (Hansen et al., 2019), *Trichuris muris* (Tritten et al., 2017), *Fasciola hepática* (Marcilla et al., 2012) e *Taenia pisciformis* (Wang et al. 2017), entre outros. A liberação de proteínas através de vesículas extracelulares para o ambiente do hospedeiro poderia explicar a presença inusual destes tipos de proteínas, como parte importante dos produtos de E/S de *S. venezuelensis*.

Vários estudos tem mostrado que as enzimas metabólicas de muitas espécies de parasitos podem estar presentes extracelularmente, sendo aderidas à superfície ou secretadas dentro de vesículas extracelulares. Nesse nível extracelular, essas enzimas metabólicas também podem desempenhar outras funções adicionais, atuando principalmente no metabolismo de nutrientes ou atuando como ligantes para uma variedade de proteínas do hospedeiro. Essas ligações estratégicas permitem que os parasitos possam participar de várias interações importantes, tais como aquisição de moléculas para nutrição, adesão e invasão, modulação da angiogênese e modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Gómez-Arreaza et al. 2014).

No presente estudo, várias enzimas metabólicas, incluindo fosfoenolpiruvato carboxiquinase, glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, malato desidrogenase, frutose-bifosfato aldolase, adenilato quinase e lactato desidrogenase foram encontradas em ambos os tipos de produtos E/S de *S. venezuelensis*, os quais foram previamente descritos como proteínas de ligação ao plasminogênio em outros

helmintos (Gómez-Arreaza et al. 2014; González-Miguel et al. 2016; Ayón-Núñez et al. 2018; Diosdado et al. 2020).

Um estudo mais detalhado da enolase de 47 kDa identificada em ambos os tipos de produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* demonstrou que a enzima é uma das proteínas com maior cobertura de identificação, é imunogênica e possui o sítio de união específica ao plasminogênio, similar às enolases de bactérias e parasitos patogênicos descritos por outros autores (Ayón-Núñez et al. 2018).

Outras proteínas tais como a actina, galectina e a proteína ribossomal ácida 60S encontradas nos produtos de E/S de *S. venezuelensis* também foram descritas como proteínas de ligação ao plasminogênio (Ayón-Núñez et al. 2018; Diosdado et al. 2020). Todos estes achados sugerem que a iL3 de *S. venezuelensis* pode recrutar moléculas de plasminogênio mediante a união ao sítio específico da enolase ou da união inespecífica aos resíduos de lisina presentes na superfície das outras proteínas. O plasminogênio pode ser convertido em plasmina (serinoprotease) pelo ativador de plasminogênio tecidual e utilizá-la para degradar a matriz extracelular dos tecidos, facilitando assim sua mimetização e livre migração através dos diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro.

Um grupo interessante de proteínas identificadas em ambos os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* são as proteínas de domínio CAP. Um total de seis proteínas CAP de diferentes PM foram identificadas no presente estudo, das quais apenas três proteínas (A0A0K0G1T0, A0A0K0FXA8, A0A0K0FJA1) estiveram presentes apenas nos produtos E/S-RPMI, formam parte da fração imunogênica LMW e foram classificadas como potencialmente imunogênicas, das quais a proteína A0A0K0FXA8 de 33 kDa se destaca pela sua maior similaridade com o antígeno NIE de *S. stercoralis*, sobre tudo na região do domínio CAP.

O estudo detalhado da proteína CAP A0A0K0FXA8 mostra que a proteína possui diversos elementos chave para ser uma proteína que pode participar na modulação da resposta imune do hospedeiro, já que o domínio CAP possui uma cavidade para capturar e sequestrar leucotrienos, moléculas importantes que participam nos processos de inflamação aguda, aumentando a permeabilidade vascular na zona afetada do tecido. Ademais, a proteína A0A0K0FXA8 também possui o sítio “KGD” presente na desintegrina barbourin, que reconhece

especificamente à integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ das plaquetas, inibindo a agregação plaquetária (Scarborough et al. 1991).

Outro grupo de proteínas que merecem especial atenção são as proteínas 14-3-3 de 27,9 kDa (A0A0K0FYU5) e 33,7 kDa (A0A0K0FYU3), ambas identificadas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS de iL3 de *S. venezuelensis*. Vários estudos identificaram a presença das proteínas 14-3-3 nos produtos de E/S de vários helmintos parasitos, sendo liberados especificamente dentro de vesículas extracelulares e, curiosamente, outros estudos demonstraram que essas vesículas extracelulares foram capazes de internalizar-se no citoplasma das células do hospedeiro, estrategicamente para modular diversas vias de sinalização intracelulares, podendo assim modular a inflamação e a resposta imune do hospedeiro (Marcilla et al. 2012; Wang et al. 2020).

Por outro lado, alguns autores tem mostrado que as proteínas 14-3-3 foram também capazes de aderir-se à superfície de células mononucleares do hospedeiro, com efeitos moduladores na produção de citocinas, proliferação celular e migração (Gadahi et al. 2016; Tian et al. 2018).

Um estudo detalhado das duas proteínas 14-3-3 de *S. venezuelensis* demonstrou que ambas possuem um alto grau de similaridade estrutural quando comparadas com seus homólogos presentes no ser humano e no camundongo. Ademais, ambas as proteínas demonstraram possuir o potencial para reconhecer resíduos fosforilados de serina/treonina de proteínas chave das diferentes vias de sinalização intracelular que incluem a modulação da ativação de células linfócitos T e B, células chave implicadas no início e organização da resposta imune adaptativa contra o parasito. Diferentes autores têm descrito e demonstrado que os helmintos parasitos são expertos em modular a inflamação e a resposta imune adaptativa para uma resposta de células T reguladoras, que favorecem a sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro (Maizels et al. 2018). No caso da iL3 de *S. venezuelensis*, o parasito poderia utilizar especificamente as proteínas 14-3-3 para modular as diferentes vias de ativação da inflamação e da ativação dos linfócitos T e B durante sua migração pelos diferentes tecidos do hospedeiro até alcançar seu destino final, o duodeno.

Em relação ao potencial imunodiagnóstico, uma forma recombinante da proteína 14-3-3 de *S. stercoralis* foi produzida e avaliada como potencial candidato

para detecção de anticorpos IgG mediante o teste de ELISA, apresentando 96% de sensibilidade e 93,8% de especificidade (Masoori et al. 2019).

Finalmente, todos os nossos resultados mostram que a iL3 de *S. venezuelensis* possui um conjunto interessante de proteínas com propriedades imunomoduladoras e que podem ser liberadas para o ambiente externo pela via secretora clássica e estrategicamente dentro de vesículas extracelulares. Mediante o uso da espectrometria de massas e a análise bioinformática, foi possível determinar as características bioquímicas dos componentes antigênicos dos produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* identificados inicialmente por WB, mostrando que as iL3 de *S. venezuelensis* podem liberar *in vitro* diferentes perfis de proteínas dependendo das condições aonde elas foram expostas. Estudos futuros serão necessários para caracterizar e determinar as funções específicas das diferentes proteínas identificadas nos produtos de E/S de *S. venezuelensis* e seu papel na interação parasito-hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

- Os produtos de excreção/secreção (E/S) de larvas infectantes (iL3) de *S. venezuelensis* obtidos após incubação em médio RPMI 1640 (E/S-RPMI) ou em tampão fosfato salino (E/S-PBS) possuem 20 e 21 bandas proteicas, respectivamente, com pesos moleculares entre 10 a 348 kDa, quando separados mediante eletroforese em gel de poliacrilamida;
- A zimografia demonstrou que os produtos de E/S de iL3 de *S. venezuelensis* contêm serinoproteases e metaloproteases.
- O *Western-blotting* demonstrou que os produtos de E/S-RPMI e E/S-PBS possuem 17 e 16 bandas antigênicas, respectivamente, que foram reconhecidas por anticorpos IgG do soro dos pacientes com estrogiloidíase.
- Uma banda de 36 kDa possui um 93% de sensibilidade, 100% de especificidade e sem ocorrência de reatividade cruzada.
- A espectrometria de massas identificou um total de 71 e 62 proteínas nos produtos E/S-RPMI e E/S-PBS, respectivamente, das quais apenas 14 proteínas antigênicas foram compartilhadas entre ambos os tipos de produtos de E/S.
- A análise bioinformática sugere que mais de 50% das proteínas identificadas nos produtos de E/S são secretadas ao meio extracelular dentro de vesículas extracelulares ou exossomos e menos de 20% são realmente secretadas pela via clássica.
- Uma arginina quinase não glicosilada de 37 kDa está presente em ambos os tipos de produtos de E/S e coincide com a banda de 36 kDa anteriormente mencionada.
- Uma proteína de domínio CAP de 30,5 kDa possui 50% de identidade com a proteína recombinante NIE de *S. stercoralis*, tem o potencial para capturar ácidos graxos e leucotrienos, e possui a sequência “KGD” com capacidade para se unir especificamente à integrina das plaquetas, inibindo assim a agregação plaquetária.
- Uma enolase não glicosilada de 47 kDa foi identificada em ambos os produtos de E/S e coincide com uma banda antigênica de 47 kDa reconhecida por mais do 96% dos pacientes com estrogiloidíase.
- A enolase de 47 kDa possui o potencial para se unir ao plasminogênio, podendo ser utilizada ativamente pela iL3 de *S. venezuelensis* durante sua migração pelos tecidos do hospedeiro.

- Duas proteínas 14-3-3, de 27,9 kDa e 33,7 kDa, foram identificadas em ambos os tipos de produtos de E/S, são potencialmente antigênicas e são secretadas dentro de vesículas extracelulares.
- As duas proteínas 14-3-3 possuem a capacidade de união a diferentes proteínas fosforiladas, relacionadas com a ativação de linfócitos T e B, sugerindo um possível papel fundamental na modulação da inflamação e da resposta imune do hospedeiro.
- Futuros estudos serão necessários para caracterizar e determinar as funções específicas dos produtos E/S de iL3 de *S. venezuelensis* e seu papel na interação hospedeiro-parasito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, Ikeshiro T. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol.* 1990; 76(3): 425-428.

Asojo OA, Darwiche R, Gebremedhin S, Smant G, Lozano-Torres JL, Drurey C, Pollet J, Maizels RM, Schreiner R, Wilbers RHP. *Heligmosomoides polygyrus* Venom Allergen-like Protein-4 (HpVAL-4) is a sterol binding protein. *Int J Parasitol.* 2018; 48(5): 359-369.

Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes RJ, Laclette JP. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci Rep.* 2018; 38(5): BSR20180705.

Barrett J, Jefferies JR, Brophy PM. Parasite proteomics. *Parasitol Today.* 2000; 16(9): 400-403.

Barrett J. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology.* 2009; 136(12): 1633-1642.

Berglund L, Andrade J, Odeberg J, Uhlén M. The epitope space of the human proteome. *Protein Sci.* 2008; 17(4): 606-13.

Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2003; 49(2): 411-423.

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

Bosqui LR, Gonçalves AL, Gonçalves-Pires Mdo R, Custodio LA, de Menezes MC, Murad VA, de Paula FM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Trop.* 2015; 150: 190-195.

Brindley PJ, Gam AA, McKerrow JH, Neva FA. Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Exp Parasitol*. 1995; 80(1): 1-7.

Brindley PJ, Gam AA, Pearce EJ, Poindexter RW, Neva FA. Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988; 28(3): 171-180.

Buonfrate D, Bisanzio D, Giorli G, Odermatt P, Fürst T, Greenaway C, French M, Reithinger R, Gobbi F, Montresor A, Bisoffi Z. The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Pathogens*. 2020; 9(6): 468.

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

Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*. 2000; 192(3): 280-288.

Choudhary V, Darwiche R, Gfeller D, Zoete V, Michielin O, Schneider R. The caveolin-binding motif of the pathogen-related yeast protein Pry1, a member of the CAP protein superfamily, is required for in vivo export of cholesteryl acetate. *J Lipid Res*. 2014; 55(5): 883-894.

Cornejo-Granados F, Hurtado-Ramírez JM, Hernández-Pando R, Ochoa-Leyva A. Secret-AAR: a web server to assess the antigenic density of proteins and homology search against bacterial and parasite secretome proteins. *Genomics*. 2019; 111(6): 1514-1516.

Corral MA, Paula FM, Meisel DM, Castilho VL, Gonçalves EM, Levy D, Bydlowski SP, Chieffi PP, Castro-Borges W, Gryscek RC. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology*. 2017; 144(2): 124-130.

Cunha RA, de Carvalho EFG, de Sousa JEN, Costa-Cruz JM. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. *Parasitol Int.* 2017; 66(5): 671-676.

Cwiklinski K, de la Torre-Escudero E, Trelis M, Bernal D, Dufresne PJ, Brennan GP, O'Neill S, Tort J, Paterson S, Marcilla A, Dalton JP, Robinson MW. The Extracellular vesicles of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis pathways and cargo molecules involved in parasite pathogenesis. *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14(12): 3258-3273.

Darwiche R, Lugo F, Drurey C, Varossieau K, Smant G, Wilbers RHP, Maizels RM, Schneider R, Asojo OA. Crystal structure of *Brugia malayi* venom allergen-like protein-1 (BmVAL-1), a vaccine candidate for lymphatic filariasis. *Int J Parasitol.* 2018; 48(5): 371-378.

Darwiche R, Mène-Saffrané L, Gfeller D, Asojo OA, Schneider R. The pathogen-related yeast protein Pry1, a member of the CAP protein superfamily, is a fatty acid-binding protein. *J Biol Chem.* 2017; 292(20): 8304-8314.

Di Bartolo V, Montagne B, Salek M, Jungwirth B, Carrette F, Fournane J, Sol-Foulon N, Michel F, Schwartz O, Lehmann WD, Acuto O. A novel pathway down-modulating T cell activation involves HPK-1-dependent recruitment of 14-3-3 proteins on SLP-76. *J Exp Med.* 2007; 204(3): 681-691.

Diosdado A, Simón F, Morchón R, González-Miguel J. Pro-fibrinolytic potential of the third larval stage of *Ascaris suum* as a possible mechanism facilitating its migration through the host tissues. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1): 203.

Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires Mdo R, Gonçalves AL, Rodrigues RM, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67(2): 153-161.

Fonseca PDM, Corral MA, Cosenza-Contreras M, Meisel DMCL, Melo GB, Antunes MMS, Santo MCE, Gryscek RCB, Costa-Cruz JM, Castro-Borges W, Paula FM. Shotgun proteomics of *Strongyloides venezuelensis* infective third stage

larvae: Insights into host-parasite interaction and novel targets for diagnostics. *Mol Biochem Parasitol.* 2020; 235: 111249.

Gamir J, Darwiche R, Van't Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneider R, Mauch F. The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* 2017; 89(3): 502-509.

Gao H, Xiao D, Song L, Zhang W, Shen S, Yin X, Wang J, Ke X, Yu C, Zhang J. Assessment of the diagnostic efficacy of enolase as an indication of active infection of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res.* 2016; 115(1): 151-164.

Genta RM, Lillibridge JP. Prominence of IgG4 antibodies in the human responses to *Strongyloides stercoralis* infection. *J Infect Dis.* 1989; 160(4): 692-699.

Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins-roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008; 29(7): 865-897.

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

González-Miguel J, Siles-Lucas M, Kartashev V, Morchón R, Simón F. Plasmin in parasitic chronic infections: Friend or foe? *Trends Parasitol.* 2016; 32(4): 325-335.

Grove DI, Blair AJ. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30(2): 344-349.

Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, Fujita J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(4): 683-684.

Iriemenam NC, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitol Int.* 2010; 59(1): 9-14.

Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell WH, Patton JG, Rome LH, Burnette DT, Coffey RJ. Reassessment of exosome composition. *Cell*. 2019; 177(2): 428-445.e18.

Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(W1): W24-W29.

Kelleher A, Darwiche R, Rezende WC, Farias LP, Leite LC, Schneider R, Asojo OA. *Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 4 (SmVAL4) is a novel lipid-binding SCP/TAPS protein that lacks the prototypical CAP motifs. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014; 70(Pt 8): 2186-2196.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.

Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006; 2: 2.

Lindo JF, Conway DJ, Atkins NS, Bianco AE, Robinson RD, Bundy DA. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51(2):175-179.

Lok JB. *Strongyloides stercoralis*: a model for translational research on parasitic nematode biology. *WormBook*. 2007; Feb 17:1-18. doi: 10.1895/wormbook.1.134.1.

Machado ER, Ueta MT, de Fátima Gonçalves-Pires Mdo R, 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(6): 849-851.

Maeda Y, Palomares-Rius JE, Hino A, Afrin T, Mondal SI, Nakatake A, Maruyama H, Kikuchi T. Secretome analysis of *Strongyloides venezuelensis* parasitic stages reveals that soluble and insoluble proteins are involved in its parasitism. *Parasit Vectors*. 2019; 12(1): 21.

Maizels RM, Smits HH, McSorley HJ. Modulation of host immunity by helminths: The expanding repertoire of parasite effector molecules. *Immunity*. 2018; 49(5): 801-818.

Marcilla A, Sotillo J, Pérez-García A, Igual-Adell R, Valero ML, Sánchez-Pino MM, Bernal D, Muñoz-Antolí C, Trelis M, Toledo R, Esteban JG. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology*. 2010; 137(10): 1577-1583.

Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, Valero ML, Sánchez del Pino MM, Muñoz-Antoli C, Toledo R, Bernal D. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45974.

Martins WA, Melo AL, Nicoli JR, Cara DC, Carvalho MAR, Lana MA, Vieira EC, Farias LM. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J Med Microbiol*. 2000; 49(4): 387-390.

Maruyama H, Nishimaki A, Takuma Y, Kurimoto M, Suzuki T, Sakatoku Y, Ishikawa M, Ohta N. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology*. 2006; 132(Pt3): 411–418.

Masoori L, Falak R, Mokhtarian K, Bandehpour M, Razmjou E, Jalallou N, Jafarian F, Akhlaghi L, Meamar AR. Production of recombinant 14-3-3 protein and determination of its immunogenicity for application in serodiagnosis of strongyloidiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113(6): 326-331.

Matsumoto H, Haniu H, Komori N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*. 2019; 1855: 101-105.

Mimori T, Tanaka M, Tada I. *Strongyloides ratti*: formation of protection in rats by excretory/secretory products of adult worms. *Exp Parasitol*. 1987; 64(3): 342-346.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. *Rev Saú Públ*. 1948; 1: 507-624.

Nagaraj SH, Gasser RB, Ranganathan S. Needles in the EST haystack: large-scale identification and analysis of excretory-secretory (ES) proteins in parasitic nematodes using expressed sequence tags (ESTs). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9): e301.

Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, Muhammad Hafiznur Y, Low HC, Zeehaida M, Noordin R. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. *Parasite Immunol*. 2013; 35(5-6): 174-179.

Northern C, Grove DI. Antigenic analysis of *Strongyloides ratti* infective larvae and adult worms. *Immunol Cell Biol*. 1987; 65(3): 231-239.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(10): 967-972.

Osorio-Aguilar Y, Gonzalez-Vazquez MC, Hernandez-Ceron DE, Lozano-Zarain P, Martinez-Laguna Y, Gonzalez-Bonilla CR, Rocha-Gracia RDC, Carabarin-Lima A. Structural Characterization of Haemophilus influenzae Enolase and Its Interaction with Human Plasminogen by *In silico* and In Vitro Assays. *Pathogens*. 2021; 10(12): 1614.

Ponce R, León-Janampa N, Gilman RH, Liendo R, Roncal E, Luis S, Quiñones-García S, Silverstein Z, García HH, Gonzales A, Sheen P, Zimic M, Pajuelo MJ; Cysticercosis Working Group in Peru. A novel enolase from *Taenia solium* metacestodes and its evaluation as an immunodiagnostic antigen for porcine cysticercosis. *Exp Parasitol*. 2018; 191: 44-54.

Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fussedder N, Bourne PE, Sette A, Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9: 514.

Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, Chen X. Strongyloidiasis-an insight into its global prevalence and management. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(8): e3018.

Ramanathan R, Nutman T. *Strongyloides stercoralis* infection in the immunocompromised host. *Curr Infect Dis Rep*. 2008; 10(2): 105-110.

Ras-Carmona A, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Prediction of unconventional protein secretion by exosomes. *BMC Bioinformatics*. 2021; 22(1): 333.

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

Rebello KM, Siqueira CR, Ribeiro EL, Valente RH, Mota EM, Perales J, Neves-Ferreira AG, Lenzi HL. Proteolytic activity in the adult and larval stages of the human roundworm parasite *Angiostrongylus costaricensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(6): 752-759.

Requena-Méndez A, Buonfrate D, Bisoffi Z, Munoz J. Advances in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Curr Trop Med Rep*. 2014; 1(4): 207-215.

Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(1): e2002.

Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(8):1891-1907.

Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, Wongkham C, Insawang T, Maleewong W. *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol Res*. 2016; 115(10): 4007-4012.

Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, Wongkham C, Insawang T, Maleewong W. Identification of antigenic proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. *Parasitol Res*. 2017; 116(6):1687-1693.

Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sopelete MC, Silva DA, Campos DM, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. Parasitol Res. 2007; 101(5): 1209-1214.

Rodrigues RM, Sopelete MC, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(1): 89-93.

Rokni MB, Kia EB. Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay, using somatic and excretory-secretory antigens of *Strongyloides stercoralis* for the serodiagnosis of strongyloidosis. Iran J Public Health. 1; 34(1): 8-12.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematódeos das fezes: modificação do método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954; 53: 248-250.

Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(3): 248-250.

Satoh M, Toma H, Sato Y, Kikuchi M, Takara M, Shiroma Y, Kiyuna S, Hirayama K. Production of a high level of specific IgG4 antibody associated with resistance to albendazole treatment in HLA-DRB1*0901-positive patients with strongyloidiasis. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61(4): 668-671.

Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, Phillips DR, Fried VA, Campbell AM, Nannizzi L, Charo IF. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. J Biol Chem. 1991; 266(15): 9359-62.

Schmidt A, Forne I, Imhof A. Bioinformatic analysis of proteomics data. BMC Syst Biol. 2014;8 Suppl 2(Suppl 2): S3.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1996; 68(5): 850-858.

Shui JW, Boomer JS, Han J, Xu J, Dement GA, Zhou G, Tan TH. Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol.* 2007; 8(1): 84-91.

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

Soini L, Leysen S, Davis J, Ottmann C. A biophysical and structural analysis of the interaction of BLNK with 14-3-3 proteins. *J Struct Biol.* 2020; 212(3): 107662.

Soini L, Leysen S, Davis J, Westwood M, Ottmann C. The 14-3-3/SLP76 protein-protein interaction in T-cell receptor signalling: a structural and biophysical characterization. *FEBS Lett.* 2021; 595(3): 404-414.

Sotillo J, Pearson M, Becker L, Mulvenna J, Loukas A. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. *Int J Parasitol.* 2015; 45(8): 505-516.

Sotillo J, Pearson M, Potriquet J, Becker L, Pickering D, Mulvenna J, Loukas A. Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contains protein vaccine candidates. *Int J Parasitol.* 2016; 46(1):1-5.

Sotillo J, Sanchez-Flores A, Cantacessi C, Harcus Y, Pickering D, Bouchery T, Camberis M, Tang SC, Giacomini P, Mulvenna J, Mitreva M, Berriman M, LeGros G, Maizels RM, Loukas A. Secreted proteomes of different developmental stages of the gastrointestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13(10): 2736-2751.

Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, Scholl S, Müller N, Gottstein B, Hemphill A. *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite-host cell interactions. *Int J Parasitol.* 2010; 40(13): 1563-1574.

Toledo B, Corral MA, Meisel DMCL, Gottardi M, Abdala E, Costa SF, Pierrotti LC, Lescano SAZ, Gonçalves EMN, Castilho VLP, Chieffi PP, Gryscek RCB, Paula

FM. Screening of *Strongyloides* infection using an ELISA test in transplant candidates. Clinics (Sao Paulo). 2019; 74: e698.

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(5): 881-883.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60(6): 967-973.

Varatharajalu R, Parandaman V, Ndao M, Andersen JF, Neva FA. *Strongyloides stercoralis* excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. Microbiol Immunol. 2011; 55(2): 115-122.

Varghese A, Raina OK, Chandra D, Mirdha BR, Kelawala NH, Solanki JB, Kumar N, Ravindran R, Arun A, Rialch A, Lalrinkima H, Kelawala RN, Samanta S. Serodetection of *Toxocara canis* infection in human with *T.canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. Acta Parasitol. 2017; 62(4): 775-778.

Vasquez-Rios G, Pineda-Reyes R, Pineda-Reyes J, Marin R, Ruiz EF, Terashima A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. J Parasit Dis. 2019; 43(2): 167-175.

Vendelova E, Camargo de Lima J, Lorenzatto KR, Monteiro KM, Mueller T, Veepaschit J, Grimm C, Brehm K, Hrčková G, Lutz MB, Ferreira HB, Nono JK. Proteomic analysis of excretory-secretory products of *Mesocestoides corti* metacestodes reveals potential suppressors of dendritic cell functions. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(10): e0005061.

Wang T, Van Steendam K, Dhaenens M, Vlaminck J, Deforce D, Jex AR, Gasser RB, Geldhof P. Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(10): e2467.

Wang X, Li JP, Kuo HK, Chiu LL, Dement GA, Lan JL, Chen DY, Yang CY, Hu H, Tan TH. Down-regulation of B cell receptor signaling by hematopoietic progenitor

kinase 1 (HPK1)-mediated phosphorylation and ubiquitination of activated B cell linker protein (BLNK). *J Biol Chem.* 2012a; 287(14): 11037-11048.

Wang X, Li JP, Chiu LL, Lan JL, Chen DY, Boomer J, Tan TH. Attenuation of T cell receptor signaling by serine phosphorylation-mediated lysine 30 ubiquitination of SLP-76 protein. *J Biol Chem.* 2012b; 287(41): 34091-34100.

Weatherhead JE, Mejia R. Immune response to infection with *Strongyloides stercoralis* in patients with infection and hyperinfection. *Curr Trop Med Rep.* 2014; 1(4): 229-233.

Xu X, Francischetti IM, Lai R, Ribeiro JM, Andersen JF. Structure of protein having inhibitory disintegrin and leukotriene scavenging functions contained in single domain. *J Biol Chem.* 2012; 287(14): 10967-10976.

Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev.* 2013; 113(4): 2343-2394.

Zhao L, Poschmann G, Waldera-Lupa D, Rafiee N, Kollmann M, Stühler K. OutCyte: a novel tool for predicting unconventional protein secretion. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 19448.

8. ANEXOS

Tabela Suplementar 1

Proteínas identificadas nos produtos E/S-PRMI de larvas infectantes de *S. venezuelensis* mediante espectrometria de massas

Uniprot accession	-10lgP	Cov (%)	#Pepts	#Uniq	Theo MW	pI	Mature MW	Description	SignalP	Outcyte	ExoPred	TMHMM 2.0	N-Glyco	O-Glyco	Fraction	AAR value
A0A0K0G2I5	26.02	0	2	2	592.974	6.02	589.488	Myotactin form A	1	Signal peptide	0	1	0	153	1	26.09
A0A0K0EWJ5	31.39	0	3	3	465.559	5.84	465.555	Karst	0	Intracellular	1	0	0	175	1	40.98
A0A0K0F7N6	21.07	0	1	1	404.472	5.37	404.470	Laminin subunit alpha-5	1	Signal peptide	0	0	0	173	1	35.72
A0A0K0FEZ1	21.36	4	1	1	270.534	7.45	270.534	ATP-dependent DNA helicase	0	Intracellular	1	0	0	18	1	52.48
A0A0K0FFX3	25.57	0	2	2	270.297	5.36	270.300	Spectrin beta chain	0	Intracellular	1	0	0	95	1	41.41
A0A0K0G4P8	21.3	1	1	1	233.782	5.5	233.782	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	62	1	40.57
A0A0K0EZX5	21.3	0	1	1	230.423	5.52	230.423	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	61	1	42.17
A0A0K0FVT1	21.3	1	1	1	228.201	5.82	228.201	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	60	1	32.97
A0A0K0FYS1	21.3	1	1	1	227.735	5.44	227.735	Myosin-3	0	Intracellular	1	0	0	56	1	34.17
A0A0K0EVL4	21.3	1	1	1	227.057	5.53	227.057	Myosin heavy chain	0	Intracellular	1	0	0	44	1	32.38
A0A0K0FFD5	27.21	0	2	2	228.598	5.11	226.152	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	3	5	366	1	36.25
A0A0K0F3W6	21.22	1	2	2	220.295	5.03	220.295	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	13	1	47.44
A0A0K0FPQ6	33.03	1	2	2	186.767	5.9	186.761	DNA polymerase	0	Intracellular	1	0	0	13	1	53.53

A0A0K0FZN1	28.14	1	2	1	171.149	6.47	169.075	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	0	2	103	1	36.64
A0A0K0EVB3	20.47	0	1	1	152.102	5.8	152.102	Amidohydro-rel domain-containing protein	0	Intracellular	1	0	0	75	1	33.56
A0A0K0FYR1	21.22	0	1	1	149.357	9.43	149.357	RNase NYN domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	15	1	60.71
A0A0K0F456	24.48	0	1	1	143.255	6.54	143.255	Protein RIC1 homolog	0	UPS	1	0	0	32	1	63
A0A0K0FH30	31.75	1	3	3	138.395	6.18	136.095	Neuroglian	1	Signal peptide	0	1	3	7	1	33.56
A0A0K0FZT7	35.43	2	4	4	125.57	9.42	125.570	Histone-lysine N-methyltransferase	0	Intracellular	1	0	0	127	1	51.86
A0A0K0F830	20.39	0	1	1	118.003	6.68	118.003	Adenylate cyclase	0	UPS	0	10	0	6	2	61.12
A0A0K0F465	20.82	1	1	1	117.684	9.64	114.595	Peroxidasin-like protein	1	Signal peptide	0	0	4	0	2	37.54
A0A0K0F0E3	20.24	1	1	1	113.603	4.99	111.147	Calsyntenin-1	1	Signal peptide	0	1	5	0	2	40.12
A0A0K0F3T7	38.03	3	2	2	109.957	6.45	109.957	Aminopeptidase EC 3.4.11.	0	UPS	1	0	0	0	2	53.72
A0A0K0FL11	21.3	1	1	1	110.501	7.04	107.659	Peroxidasin-like protein	1	Signal peptide	0	0	2	9	2	48.4
A0A0K0FAE3	20.82	1	1	1	103.459	6.66	103.459	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	0	0	2	37.29
A0A0K0FG75	20.93	1	1	1	102.918	6.82	102.918	Tudor domain-containing protein	0	Intracellular	1	0	0	15	2	35.28
A0A0K0EV85	21.42	1	1	1	94.563	6.05	94.563	Degenerin unc-8	0	Intracellular	0	2	0	17	2	41.45
A0A0K0F9R3	22.05	1	1	1	89.934	4.87	89.934	Calpain-2 catalytic subunit	0	Intracellular	1	0	0	9	2	33.24
A0A0K0FK28	26.42	1	2	2	81.849	4.93	81.849	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	2	2	59.08

A0A0K0F4D9	31.78	1	1	1	78.412	5.94	78.412	Tr-type G domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	0	2	41.18
A0A0K0G0S7	54.4	4	2	2	73.944	6.03	73.944	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	0	Intracellular	1	0	0	3	2	32.9
A0A0K0FYM2	20.93	1	1	1	65.394	7.56	65.394	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	3	63.22
A0A0K0G292	77.38	10	5	5	62.193	6.52	62.193	Glucose-6-phosphate isomerase	0	UPS	1	0	0	0	3	39.57
A0A0K0F6Y2	21.22	1	1	1	58.413	7.16	58.413	X-ray repair cross-complementing protein 6	0	Intracellular	0	0	0	1	3	123.75
A0A0K0F9F9	50.83	5	2	2	57.563	5.89	57.563	Phosphoglycerate mutase	0	Intracellular	1	0	0	2	3	37
A0A0K0F6C3	101.1	15	8	8	55.676	6	55.676	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	0	3	36.14
A0A0K0FVDS	21.21	1	1	1	52.276	5.96	52.276	ANK_REP_REGION domain-containing protein	0	UPS	0	1	0	7	4	46.1
A0A0K0FMY5	40.6	2	1	1	49.083	6.36	49.082	Fumarylacetoacetase, EC 3.7.1.2	0	UPS	1	0	1	1	4	40.18
A0A0K0FKU3	108.11	24	9	8	47.168	6.04	47.168	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Enolase)	0	UPS	1	0	0	0	4	31.07
A0A0K0EX00	20.02	3	1	1	46.015	6.04	46.015	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	0	UPS	1	0	0	0	4	40.9
A0A0K0G262	25.14	2	1	1	44.313	7.43	44.313	Uncharacterized protein	0	UPS	0	0	0	27	4	49.25
A0A0K0FV38	101.1	20	8	8	41.81	5.3	41.810	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	4	37.7
A0A0K0FL48	101.1	20	8	8	41.792	5.3	41.792	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	4	37.7
A0A0K0FYF9	104.31	26	7	7	40.957	8.91	40.957	Malate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	4	37.5

A0A0K0G1T0	22.9	1	1	1	42.994	10.33	40.668	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	1	41	4	34.73
A0A0K0FPH6	20.47	1	1	1	40.636	9.14	40.636	72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase	0	UPS	0	0	0	4	4	69
A0A0K0F7B1	102.09	22	8	8	39.485	6.32	39.485	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	3	5	28.08
A0A0K0FTY1	26.24	5	1	1	38.707	7.51	38.707	Adenylate kinase isoenzyme 1	0	Transmembrane	0	1	0	16	5	34.7
A0A0K0EZR7	72.59	13	4	2	37.039	7.57	37.039	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	0	5	36.89
A0A0K0FH91	27.55	4	1	1	36.262	6.8	36.262	L-lactate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	5	67
A0A0K0FZ76	20.18	0	1	1	34.501	9.4	34.501	Uncharacterized protein	0	UPS	1	0	0	0	5	58.6
A0A0K0FW12	25.53	9	2	2	34.273	6.99	34.273	60S acidic ribosomal protein P0	0	Intracellular	1	0	0	3	5	52.5
A0A0K0FYU3	100.6	26	8	2	33.738	4.81	33.738	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	5	25.08
A0A0K0FDI0	21.33	1	1	1	32.832	9.11	32.832	CCHC-type domain-containing protein	0	UPS	1	0	0	2	5	58.2
A0A0K0F5G7	36.43	4	1	1	31.489	6.32	31.489	S-formylglutathione hydrolase	0	UPS	1	0	0	0	5	69.75
A0A0K0FXA8	68.68	14	4	4	33.034	9.79	30.495	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	16	5	36.75
A0A0K0G0W1	20.04	2	1	1	30.15	8.33	30.150	Col_cuticle_N domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	0	5	74.25
A0A0K0FYU5	97.2	28	7	1	27.933	4.8	27.933	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	6	24.6
A0A0K0FZR7	44.82	9	2	2	27.346	9.63	27.346	CAP domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	5	6	77.67

A0A0K0EZ63	20.39	1	1	1	27.988	4.85	25.655	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	0	2	0	6	50.6
A0A0K0EU20	64.26	14	3	3	26.911	8.85	24.779	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	0	1	5	6	41.5
A0A0K0FJA1	144.59	53	15	8	23.428	9.41	21.402	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	4	7	26.75
A0A0K0FX99	123.49	50	13	1	22.395	9.21	20.343	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	2	7	50.25
A0A0K0F4S7	125.4	51	14	5	22.556	9.32	19.797	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	1	7	67
A0A0K0F270	25.88	1	2	2	18.2	6.64	18.200	Uncharacterized protein	0	UPS	1	0	0	0	7	156
A0A0K0G1D7	41.56	8	1	1	16.882	7.87	16.882	Nucleoside diphosphate kinase	0	UPS	1	0	0	1	8	38.25
A0A0K0F262	35.12	5	1	1	16.789	6.08	16.789	ADF-H domain-containing protein	0	UPS	1	0	0	1	8	25.5
A0A0K0FKC0	24.19	3	1	1	16.46	10.16	16.460	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	10	8	28.8
A0A0K0EX94	29.08	3	2	2	15.202	9.37	15.202	Uncharacterized protein	0	UPS	1	0	0	1	8	44
A0A0K0EVZ4	24.19	4	1	1	12.722	9.05	12.722	Uncharacterized protein	0	UPS	1	0	0	2	8	39
A0A0K0G4H4	20.29	7	1	1	8.293	9.52	7.730	Uncharacterized protein	0	Transmembrane	0	1	0	2	8	68

Abreviaturas: -10lgP = pontuação de confiança de peptídeo; Cov (%) = Porcentagem de cobertura; #Pepts = Número total de peptídeos; #Uniq = Número de peptídeos únicos; Theo MW = Peso molecular teórico; pI = Ponto isoelétrico; Mature MW = Peso molecular da proteína madura; SignalP = Peptídeo sinal (presente = 1 ou ausente = 0); UPS = secreção de proteínas por via não convencional; Exopred = Secreção de proteínas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos (sim = 1 ou não = 0); TMHMM 2.0 = Predição de regiões transmembrana (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); N-Glyco = N-glicosilação (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); O-glyco = O-glicosilação (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); Fraction = fração do gel de poliácridamida; AAR value = abundância de regiões antigênicas.

Tabela Suplementar 2

Proteínas identificadas nos produtos E/S-PBS de larvas infectantes de *S. venezuelensis* mediante espectrometria de massas

Uniprot accession	-10lgP	Cov (%)	#Pepts	#Uniq	Theo MW	pI	Mature MW	Description	SignalP	Outcyte	ExoPred	TMHMM 2.0	N-Glyco	O-Glyco	Fraction	AAR value
A0A0K0G2I5	20.03	0	1	1	592.974	6.02	589.488	Myotactin form A	1	Signal peptide	0	1	12	159	1	26.09
A0A0K0FL12	29.49	0	2	0	356.876	6.81	353.478	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	29	47	1	45.23
A0A0K0F652	31.55	1	2	2	237.984	9.62	237.984	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	341	1	31.45
A0A0K0EXN8	29.48	1	2	0	208.133	8.83	208.133	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	Intracellular	0	0	0	279	1	39.19
A0A0K0EW98	29.81	1	2	2	204.682	5.17	204.682	Protein transport protein sec16	0	Intracellular	1	0	0	131	1	35.82
A0A0K0EUC6	20.4	2	1	1	194.15	5.01	191.875	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	15	101	1	38.87
A0A0K0G111	29.27	0	2	2	172.431	7.66	172.431	ELYS-bb domain-containing protein	0	Transmembrane	0	1	0	130	1	60.44
A0A0K0G049	25.46	1	2	2	131.877	6.89	131.877	Short transient receptor potential channel 4	0	Intracellular	0	4	0	42	1	46.16
A0A0K0FYF3	25.63	1	2	2	123.604	6.62	123.604	Delphinin	0	Intracellular	1	0	0	51	1	39.96
A0A0K0FB18	22.08	1	1	1	111.235	8.62	112.967	Anchor cell fusion failure-1	0	Transmembrane	0	7	0	4	2	75.38
A0A0K0F0E3	20.24	1	1	1	113.603	4.99	111.147	Calsyntenin-1	1	Signal peptide	0	1	5	0	2	40.12
A0A0K0F9S9	20.13	1	1	1	103.181	8.77	103.181	[Heparan sulfate]-glucosamine N-sulfotransferase	0	Transmembrane	0	1	0	2	2	63.14
A0A0K0FXN2	23.6	0	2	1	102.39	6.04	102.390	Uncharacterized protein	0	UPS	1	1	0	20	2	49.78

A0A0K0G3F0	29.19	1	1	1	96.05	6.31	96.050	Doublecortin-like and CAM kinase-like protein	0	Intracellular	1	0	0	57	2	60.64
A0A0K0FCT6	20.38	1	1	1	82.694	6.38	82.694	Receptor protein serine/threonine kinase	1	Signal peptide	0	2	5	6	2	51.57
A0A0K0G523	24.94	1	2	2	79.674	8.04	77.240	Neuroglian	1	Signal peptide	0	1	11	5	2	49.07
A0A0K0G0S7	71.32	9	4	3	73.944	6.03	73.944	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	0	Intracellular	1	0	0	3	2	32.9
A0A0K0F7R7	24.54	2	2	2	73.643	5.59	73.643	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	2	45.64
A0A0K0FD75	33.42	3	2	2	71.998	8.91	71.998	Malic enzyme	0	Intracellular	1	0	0	5	2	39.88
A0A0K0FB44	25.98	1	2	1	67.288	8.68	67.288	Septin-2	0	Intracellular	1	0	0	33	3	36.69
A0A0K0FUU8	21.04	1	1	1	66.197	6.88	66.197	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	4	3	46.33
A0A0K0EX33	25.3	0	2	2	62.853	8.8	62.853	Pct-1	0	Intracellular	1	0	0	56	3	55.7
A0A0K0G292	47.93	3	2	2	62.193	6.52	62.193	Glucose-6-phosphate isomerase	0	UPS	1	0	0	0	3	39.57
A0A0K0EZM4	29.68	3	1	1	58.664	8.19	58.664	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	6	3	41.15
A0A0K0EZX9	27.94	1	2	1	60.954	9.15	58.524	Phosphate-regulating neutral endopeptidase	1	Signal peptide	0	1	7	14	3	52.5
A0A0K0F9F9	36.71	3	2	1	57.563	5.89	57.563	Phosphoglycerate mutase	0	Intracellular	1	0	0	2	3	37
A0A0K0F6C3	75.11	12	4	4	55.676	6	55.676	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	1	0	0	0	3	36.14
A0A0K0FUR4	23.71	4	1	1	55.573	8.35	55.573	Alanine aminotransferase 1	0	Intracellular	1	0	0	5	3	45.55

A0A0K0FTW4	37.89	6	2	2	55.113	5.78	55.112	Retinal dehydrogenase 2	0	Intracellular	1	0	0	2	3	42.58
A0A0K0F7W7	22.29	1	1	1	54.811	6.27	54.811	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	0	Intracellular	1	0	0	0	4	33.79
A0A0K0F4U1	31.31	3	3	1	54.66	6.85	54.660	MAD homolog, Mothers against DPP homolog	0	Intracellular	0	0	0	19	4	43.55
A0A0K0F078	39.68	2	1	1	52.712	8.51	52.712	Fumarate hydratase	0	UPS	1	0	0	1	4	37.46
A0A0K0F3I3	28.42	0	2	2	54.103	4.92	52.337	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	8	0	4	43.18
A0A0K0F0Y4	29.7	2	2	0	54.454	5.05	51.867	Uncharacterized protein	1	Signal peptide	0	1	3	1	4	52.44
A0A0K0FKU3	80.55	18	8	8	47.168	6.04	47.168	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	0	UPS	1	0	0	0	4	31.07
A0A0K0G2Q6	54.88	11	3	2	45.306	8.97	45.306	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	0	4	50.38
A0A0K0FXC6	23.01	1	1	1	43.968	9.47	42.046	Metalloendopeptidase	1	Signal peptide	0	0	1	2	4	63.83
A0A0K0FV38	87.23	17	6	6	41.81	5.3	41.810	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	4	37.7
A0A0K0FL48	87.23	17	6	6	41.792	5.3	41.792	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	Intracellular	0	0	0	2	4	37.7
A0A0K0FYF9	105.62	19	7	3	40.957	8.91	40.957	Malate dehydrogenase	0	UPS	1	0	0	0	4	37.5
A0A0K0FGG6	54.88	11	3	2	40.544	8.37	40.544	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	3	5	40.11
A0A0K0G127	23.12	2	1	1	39.48	7.98	39.501	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	0	5	45.88
A0A0K0F7B1	110.64	12	5	5	39.485	6.32	39.485	Fructose-bisphosphate aldolase	0	Intracellular	1	0	0	0	5	28.08

A0A0K0EZR7	113.86	30	9	2	37.039	7.57	37.039	Arginine kinase	0	UPS	1	0	0	3	5	36.89
A0A0K0FH91	33.3	4	1	1	36.262	6.8	36.262	L-lactate dehydrogenase	0	Intracellular	1	0	0	0	5	67
A0A0K0FXE7	27.13	1	2	2	34.073	9.21	34.073	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	0	Intracellular	1	0	0	0	5	58
A0A0K0EYE0	21.99	3	1	1	33.828	6.19	33.828	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	0	5	41.57
A0A0K0FYU3	45.27	4	1	1	33.738	4.81	33.738	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	5	25.08
A0A0K0EWQ2	57.93	9	3	3	35.199	7.06	33.296	Galectin	1	Signal peptide	0	0	2	4	5	52
A0A0K0F8N8	30.46	1	2	2	31.52	9.46	31.520	Uncharacterized protein	0	Intracellular	1	0	0	0	5	269
A0A0K0F5G7	52.05	4	1	1	31.488	6.32	31.489	S-formylglutathione hydrolase	0	Intracellular	1	0	0	0	5	69.75
A0A0K0G0W4	22.15	2	1	1	33.137	8.6	30.567	Peptidase S1 domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	2	5	5	42.57
A0A0K0FYU5	41.44	4	1	1	27.933	4.8	27.933	14-3-3 protein zeta	0	Intracellular	1	0	0	0	6	24.6
A0A0K0F4D5	33.3	5	1	1	24.816	7.7	24.816	Superoxide dismutase	0	UPS	1	0	0	2	6	44.2
A0A0K0FYD1	24.96	4	1	1	24.236	7.77	24.236	Hematopoietic prostaglandin D synthase	0	UPS	1	0	0	0	6	52.25
A0A0K0EWZ9	58.07	11	2	2	23.915	9.06	23.915	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1	Signal peptide	0	0	0	1	7	36.67
A0A0K0FE39	28.07	6	1	1	21.848	6.1	21.848	Thioredoxin domain-containing protein	0	UPS	1	0	0	1	7	49.5
A0A0K0FJA1	47.68	10	2	1	23.428	9.41	21.402	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	4	7	26.75
A0A0K0FX99	65.56	26	4	1	22.395	9.21	20.343	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	2	7	50.25

A0A0K0F4S7	78.85	35	6	2	22.556	9.32	19.797	CAP domain-containing protein	1	Signal peptide	0	0	0	1	7	67
A0A0K0G1V3	20.43	1	1	1	18.28	5.44	18.280	Density-regulated protein homolog	0	Intracellular	1	0	0	3	7	27.83
A0A0K0F262	38.04	14	2	2	16.789	6.08	16.789	ADF-H domain-containing protein	0	UPS	1	0	0	1	8	25.5

Abreviaturas: -10lgP = pontuação de confiança de peptídeo; Cov (%) = Porcentagem de cobertura; #Pepts = Número total de peptídeos; #Uniq = Número de peptídeos únicos; Theo MW = Peso molecular teórico; pI = Ponto isoelétrico; Mature MW = Peso molecular da proteína madura; SignalP = Peptídeo sinal (presente = 1 ou ausente = 0); UPS = secreção de proteínas por via não convencional; Exopred = Secreção de proteínas dentro de vesículas extracelulares ou exossomos (sim = 1 ou não = 0); TMHMM 2.0 = Predição de regiões transmembrana (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); N-Glyco = N-glicosilação (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); O-glyco = O-glicosilação (ausência = 0, uma região = 1, duas regiões = 2, etc); Fraction = fração do gel de poliacrilamida; AAR value = abundância de regiões antigênicas.

Tabela Suplementar 3

Classificação *Gene Ontology* das proteínas identificadas nos produtos E/S-RPMI de larvas infectantes de *S. venezuelensis* mediante espectrometria de massas

Uniprot accession	Description	Celular component	Biological process	Molecular function
A0A0K0G2I5	Myotactin form A (projected from <i>Caenorhabditis elegans</i> ortholog let-805)	Cell membrane	Cell signaling	Cytokine binding; cytokine receptor activity
A0A0K0EWJ5	Karst (inferred by orthology to a <i>D. melanogaster</i> protein)	Cytoplasm	plasma membrane organization	Actin filament binding
A0A0K0F7N6	Laminin subunit alpha-5 (inferred by orthology to a human protein)	Cell membrane	Cell adhesion	Integrin binding
A0A0K0FEZ1	ATP-dependent DNA helicase	Nucleus	DNA recombination and repair	DNA helicase activity; ATP hydrolysis activity; ATP binding
A0A0K0FFX3	Spectrin beta chain	Cytoplasm	plasma membrane organization	phospholipid binding
A0A0K0G4P8	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Cell starvation	Actin filament binding; ATP binding
A0A0K0EZX5	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Cell starvation	Actin filament binding; ATP binding
A0A0K0FVT1	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Locomotion	Actin filament binding; ATP binding
A0A0K0FYS1	Myosin-3 (inferred by orthology to a <i>C. elegans</i> protein)	Cytoplasm	Locomotion	Actin filament binding; ATP binding
A0A0K0EVL4	Myosin heavy chain (inferred by orthology to a <i>D. melanogaster</i> protein)	Cytoplasm	Locomotion	Actin filament binding; ATP binding
A0A0K0FFD5	Uncharacterized protein	Cell membrane	unknown	Unknown
A0A0K0F3W6	Uncharacterized protein	Extracellular	Multi-organism process; innate immune response	Carbohydrate binding

A0A0K0FPQ6	DNA polymerase	Nucleus	DNA replication	DNA polymerase activity; DNA binding; nucleotide binding
A0A0K0FZN1	Uncharacterized protein	Extracellular	Negative regulation of endopeptidase activity	Serine-type endopeptidase inhibitor activity
A0A0K0EVB3	Amidohydro-rel domain-containing protein	Cytoplasm	Cell division	Metal binding; protein binding
A0A0K0FYR1	RNase NYN domain-containing protein	Endoplasmic reticulum	RNA processing	RNA helicase activity; mRNA methyltransferase activity; RNA binding; ATP binding
A0A0K0F456	Protein RIC1 homolog	Golgi apparatus	Vacuole transport	protein-containing complex binding
A0A0K0FH30	Neuroglian (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cell membrane	Neuron projection development	Protease binding
A0A0K0FZT7	Histone-lysine N-methyltransferase	Nucleus	Histone methylation	Histone methyltransferase activity; nucleic acid binding
A0A0K0F830	Adenylate cyclase	Cell membrane	cAMP biosynthetic process	adenylate cyclase activity; ATP binding; magnesium ion binding; manganese ion binding
A0A0K0F465	Peroxidasin-like protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Oxidative stress	Heme binding; metal ion binding; peroxidase activity
A0A0K0F0E3	Calsyntenin-1 (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Positive regulation of synaptic assembly and transmission	Calcium ion binding
A0A0K0F3T7	Aminopeptidase EC 3.4.11.	Mitochondria	proteolysis	metalloaminopeptidase activity; peptide binding; zinc ion binding
A0A0K0FL11	Peroxidasin-like protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Oxidative stress	Heme binding; metal ion binding; peroxidase activity
A0A0K0FAE3	Uncharacterized protein	Cell membrane	Positive regulation of kinase activity	ATP binding; protein binding; transmembrane receptor tyrosine kinase activity
A0A0K0FG75	Tudor domain-containing protein	Cytoplasm	Positive regulation of autophagy	GTPase activator activity
A0A0K0EV85	Degenerin unc-8 (projected from Caenorhabditis elegans ortholog unc-8)	Cell membrane	Locomotion	Sodium channel activity
A0A0K0F9R3	Calpain-2 catalytic subunit (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	proteolysis	calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity

A0A0K0FK28	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Exocytosis	SNARE binding
A0A0K0F4D9	Tr-type G domain-containing protein	Endoplasmic reticulum	Translation	Translation elongation factor activity; GTP binding; GTPase activity; ribosome binding
A0A0K0G0S7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity; GTP binding; manganese ion binding
A0A0K0FYM2	Uncharacterized protein	Lysosome	Exocytosis	SNARE binding
A0A0K0G292	Glucose-6-phosphate isomerase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Glucose-6-phosphate isomerase activity; monosaccharide binding
A0A0K0F6Y2	X-ray repair cross-complementing protein 6 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	tRNA-guanine transglycosylation	Pentosyltransferase activity
A0A0K0F9F9	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Phosphoglycerate mutase activity; manganese ion binding
A0A0K0F6C3	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Mitochondria	cytoskeleton organization	ATP binding; identical protein binding
A0A0K0FVD8	ANK_REP_REGION domain-containing protein	Cytoplasm	mRNA stabilization	acid nucleic binding
A0A0K0FMY5	Fumarylacetoacetase, EC 3.7.1.2 (Fumarylacetoacetate hydrolase)	Mitochondria	Catabolic process	fumarylacetoacetase activity; metal ion binding
A0A0K0FKU3	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Phosphopyruvate hydratase activity; magnesium ion binding
A0A0K0EX00	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Cytoplasm	tricarboxylic acid cycle	Isocitrate dehydrogenase activity; NAD/NADP binding; protein homodimerization activity; magnesium ion binding
A0A0K0G262	Uncharacterized protein	Cytoplasm	proteolysis	Protein binding; cysteine-type endopeptidase activity
A0A0K0FV38	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	ATP binding

A0A0K0FL48	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	ATP binding
A0A0K0FYF9	Malate dehydrogenase	Cytoplasm	carbohydrate metabolic process	L-malate dehydrogenase activity
A0A0K0G1T0	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0FPH6	72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	Cell signaling	Phosphatase activity
A0A0K0F7B1	Fructose-bisphosphate aldolase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Fructose-bisphosphate aldolase activity; identical protein binding
A0A0K0FTY1	Adenylate kinase isoenzyme 1 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	Nucleoside phosphorylation	Adenylate kinase activity; ATP binding
A0A0K0EZR7	Arginine kinase	Cytoplasm	Phosphorylation	Arginine kinase activity; creatine kinase activity; ATP binding
A0A0K0FH91	L-lactate dehydrogenase	Cytoplasm	carbohydrate metabolic process	L-lactate dehydrogenase activity
A0A0K0FZ76	Uncharacterized protein	Extracellular	Protein N-glycosylation	Glycosyltransferase activity
A0A0K0FW12	60S acidic ribosomal protein P0	Cytoplasm	Ribosome biogenesis and assembly	Large ribosomal subunit rRNA binding
A0A0K0FYU3	14-3-3 protein zeta (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Cell signaling	Protein domain specific binding
A0A0K0FDI0	CCHC-type domain-containing protein	Nucleus	microRNA metabolic process	uridylyltransferase activity; microRNA binding; protein binding; zinc ion binding
A0A0K0F5G7	S-formylglutathione hydrolase	Mitochondria	Catabolic process	S-formylglutathione hydrolase activity; carboxylic ester hydrolase activity
A0A0K0FXA8	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0G0W1	Col_cuticle_N domain-containing protein	Extracellular	Cuticle development; cuticle molting cycle	Structural constituent of cuticle
A0A0K0FYU5	14-3-3 protein zeta (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Cell signaling	Protein domain specific binding

A0A0K0FZR7	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0EZ63	Uncharacterized protein	Extracellular	Signal transduction	Lysozyme activity
A0A0K0EU20	Uncharacterized protein	Extracellular	Negative regulation of endopeptidase activity; defense response	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; serine-type endopeptidase inhibitor activity
A0A0K0FJA1	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0FX99	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0F4S7	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Unknown	Unknown
A0A0K0F270	Uncharacterized protein	Nucleus	embryo development ending	GTPase activator activity; protein binding
A0A0K0G1D7	Nucleoside diphosphate kinase	Cytoplasm	Nucleoside phosphorylation	Diphosphate kinase activity; ATP binding; magnesium ion binding
A0A0K0F262	ADF-H domain-containing protein	Cytoplasm	Locomotion	Actin filament binding
A0A0K0FKC0	Uncharacterized protein	Nucleus	mRNA transport	mRNA binding; identical protein binding
A0A0K0EX94	Uncharacterized protein	Nucleus	Translation	Structural constituent of ribosome; rRNA binding
A0A0K0EVZ4	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Mitochondrial genome maintenance	Single-stranded DNA binding
A0A0K0G4H4	Uncharacterized protein	Extracellular	Cell signaling	Receptor serine/threonine kinase binding

Tabela Suplementar 4

Classificação *Gene Ontology* das proteínas identificadas nos produtos E/S-PBS de larvas infectantes de *S. venezuelensis* mediante espectrometria de massas

Uniprot accession	Description	Cellular component	Biological process	Molecular function
A0A0K0G2I5	Myotactin form A (projected from <i>Caenorhabditis elegans</i> ortholog let-805)	Cell membrane	cytoskeleton organization	cytokine receptor activity; cytokine binding
A0A0K0FL12	Uncharacterized protein	Cell membrane	unknown	scavenger receptor activity
A0A0K0F652	Uncharacterized protein	Cytoplasm	unknown	unknown
A0A0K0EXN8	Non-specific serine/threonine protein kinase	Cytoplasm	Peptidyl-threonine phosphorylation; glycogen biosynthetic process; intracellular signal transduction	Protein serine/threonine kinase activity; protein binding; ATP binding
A0A0K0EW98	Protein transport protein sec16	Cytoplasm	intracellular protein transport	protein binding
A0A0K0EUC6	Uncharacterized protein	Cell membrane	Protein catabolic process; protein stabilization	Protein kinase C binding; spectrin binding; Calcium ion binding
A0A0K0G111	ELYS-bb domain-containing protein	Nucleus	Cell proliferation	Protein binding
A0A0K0G049	Short transient receptor potential channel 4 (inferred by orthology to a human protein)	Cell membrane	Ion transmembrane transport	cadherin binding; beta-caterin binding; inositol 1,4,5 triphosphate binding; store-operated calcium channel activity
A0A0K0FYF3	Delphilin (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	actin binding; profiling binding; SH3 domain binding; small GTPase binding
A0A0K0FB18	Anchor cell fusion failure-1 (inferred by orthology to a <i>C. elegans</i> protein)	Cell membrane	Cell proliferation	Chloride channel activity
A0A0K0F0E3	Calsyntenin-1 (inferred by orthology to a <i>D. melanogaster</i> protein)	Cell membrane	Positive regulation of synaptic assembly and transmission	Calcium ion binding
A0A0K0F9S9	[Heparan sulfate]-glucosamine N-sulfotransferase	Golgi	Heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process; heparin biosynthetic process	[heparan sulfate]-glucosamine N-sulfotransferase activity; deacetylase activity

A0A0K0FXN2	Uncharacterized protein	Nucleus	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II; Lysine biosynthetic process	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding; DNA-binding transcription activator activity
A0A0K0G3F0	Doublecortin-like and CAM kinase-like protein	Cytoplasm	Protein phosphorylation; intracellular signal transduction	protein kinase activity; calmodulin binding; ATP binding
A0A0K0FCT6	Receptor protein serine/threonine kinase	Cell membrane	Signaling pathway	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity; TGF-beta receptor activity; ATP binding
A0A0K0G523	Neuroglian (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cell membrane	Neuron projection development	cell-cell adhesion mediator activity
A0A0K0G0S7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	Cytoplasm	Oxaloacetate metabolic process; gluconeogenesis;	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity; GTP binding; manganese ion binding
A0A0K0F7R7	Uncharacterized protein	Nucleus	mRNA processing; nuclear-transcribed mRNA catabolic process	Phosphodiesterase decapping endonuclease activity; RNA pyrophosphohydrolase activity; enzyme regulator binding; RNA binding; nucleotide binding; metal ion binding
A0A0K0FD75	Malic enzyme	Mitochondria	Carbohydrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	malate dehydrogenase (NAD+/NADP+) activity; oxaloacetate decarboxylase activity; NAD binding; metal ion binding; electron transfer activity
A0A0K0FB44	Septin-2 (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; molecular adaptor activity
A0A0K0FUU8	Uncharacterized protein	Nucleus	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II; termination of RNA polymerase II transcription; rRNA processing	5'-3' exoribonuclease activity; rRNA binding
A0A0K0EX33	Pct-1 (projected from Caenorhabditis elegans ortholog pct-1)	Cytoplasm	Protein phosphorylation; regulation of cell cycle	ATP binding; protein kinase activity
A0A0K0G292	Glucose-6-phosphate isomerase	Cytoplasm	carbohydrate metabolic process	Glucose-6-phosphate isomerase activity; monosaccharide binding; intramolecular transferase activity
A0A0K0EZM4	Uncharacterized protein	Mitochondria	Biotin metabolic process; short-chain fatty acid catabolic process	Propionyl-CoA carboxylase activity; ATP binding
A0A0K0EZX9	Phosphate-regulating neutral endopeptidase (inferred by orthology to a human protein)	Extracellular	Regulation of chemotaxis; proteolysis	metalloendopeptidase activity; zinc ion binding
A0A0K0F9F9	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)	Cytoplasm	carbohydrate metabolic process	Phosphoglycerate mutase activity; manganese ion binding
A0A0K0F6C3	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Mitochondria	cytoskeleton organization	ATP binding; Structural constituent of cytoskeleton; identical protein binding
A0A0K0FUR4	Alanine aminotransferase 1 (inferred by orthology to a human protein)	Mitochondria	Biosynthetic process	L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; pyridoxal phosphate binding

A0A0K0FTW4	Retinal dehydrogenase 2 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
A0A0K0F7W7	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Glutamyl-tRNA aminoacylation; translation	Glutamine-tRNA ligase activity; ATP binding
A0A0K0F4U1	Mothers against decapentaplegic homolog, MAD homolog, Mothers against DPP homolog (SMAD family member)	Nucleus	Intracellular signal transduction; signal transduction involved in regulation of gene expression	DNA-binding transcription activator activity; ubiquitin protein ligase binding; phosphatase binding
A0A0K0F078	Fumarate hydratase	Mitochondria	Carbohydrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Fumarate hydratase activity
A0A0K0F3I3	Uncharacterized protein	Cell membrane	dephosphorylation	Acid phosphatase activity
A0A0K0F0Y4	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Ion transmembrane transport	sodium channel activity
A0A0K0FKU3	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Phosphopyruvate hydratase activity; magnesium ion binding
A0A0K0G2Q6	Arginine kinase	Cytoplasm	Phosphorylation	Arginine kinase activity; creatine kinase activity; ATP binding
A0A0K0FXC6	Metalloendopeptidase	Cytoplasm	Proteolysis; protein catabolic process	metalloendopeptidase activity
A0A0K0FV38	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	ATP binding
A0A0K0FL48	Actin, alpha cardiac muscle 1 (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	cytoskeleton organization	ATP binding
A0A0K0FYF9	Malate dehydrogenase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	L-malate dehydrogenase activity
A0A0K0FGG6	Arginine kinase	Cytoplasm	Phosphorylation; phosphocreatine biosynthetic process	Arginine kinase activity; creatine kinase activity; ATP binding
A0A0K0G127	Fructose-bisphosphate aldolase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	Fructose-bisphosphate aldolase activity; identical protein binding
A0A0K0F7B1	Fructose-bisphosphate aldolase	Cytoplasm	carbohydrate metabolic process	Fructose-bisphosphate aldolase activity; identical protein binding
A0A0K0EZR7	Arginine kinase	Cytoplasm	Phosphocreatine biosynthetic process; phosphorylation	Arginine kinase activity; creatine kinase activity; ATP binding

A0A0K0FH91	L-lactate dehydrogenase	Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	L-lactate dehydrogenase activity
A0A0K0FXE7	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR (inferred by orthology to a human protein)	Nucleus	Histone methylation	Histone methyltransferase activity; nucleic acid binding
A0A0K0EYE0	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Protein ubiquitination	Ubiquitin protein ligase binding; protein kinase binding; identical protein binding
A0A0K0FYU3	14-3-3 protein zeta (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Cell Signaling	Protein domain specific binding
A0A0K0EWQ2	Galectin	Cytoplasm	Signaling pathway	carbohydrate binding
A0A0K0F8N8	Uncharacterized protein	Cytoplasm	Cell proliferation	Protein binding
A0A0K0F5G7	S-formylglutathione hydrolase	Mitochondria	formaldehyde catabolic process	S-formylglutathione hydrolase activity; carboxylic ester hydrolase activity
A0A0K0G0W4	Peptidase S1 domain-containing protein	Extracellular	Protein catabolic process	serine-type endopeptidase activity
A0A0K0FYU5	14-3-3 protein zeta (inferred by orthology to a D. melanogaster protein)	Cytoplasm	Cell Signaling	Protein domain specific binding
A0A0K0F4D5	Superoxide dismutase	Mitochondria	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
A0A0K0FVD1	Hematopoietic prostaglandin D synthase (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	Cell Signaling	Protein domain specific binding
A0A0K0EWZ9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cytoplasm	Protein folding	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity
A0A0K0FE39	Thioredoxin domain-containing protein	Cytoplasm	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
A0A0K0FJA1	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	unknown	unknown

A0A0K0FX99	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	unknown	unknown
A0A0K0F4S7	CAP domain-containing protein (inferred by orthology to a human protein)	Cytoplasm	unknown	unknown
A0A0K0G1V3	Density-regulated protein homolog (inferred by orthology to a C. elegans protein)	Cytoplasm	Cell Signaling	translation initiation factor activity
A0A0K0F262	ADF-H domain-containing protein	Cytoplasm	cytoskeleton organization	unknown
