

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**SELEÇÃO DE ALVOS IMUNOGÊNICOS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Ana Cristina Loiola Ruas

Belo Horizonte

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**SELEÇÃO DE ALVOS IMUNOGÊNICOS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Ana Cristina Loiola Ruas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helmintologia

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

2022

043

Ruas, Ana Cristina Loiola.

Seleção de alvos imunogênicos para o desenvolvimento de testes sorológicos no diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Ana Cristina Loiola Ruas. – 2022.

55 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Testes Sorológicos. 4. Peptídeos. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"SELEÇÃO DE ALVOS IMUNOGÊNICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS
NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *SCHISTOSOMA MANSONI*".

ANA CRISTINA LOIOLA RUAS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **31 DE MARÇO DE 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Silvio Santana Dolabella

UFS

Stefan Michael Geiger

UFMG

Ricardo Toshio Fujiwara

Orientador - UFMG

Belo Horizonte, 31 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2022, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvio Santana Dolabella, Usuário Externo**, em 31/03/2022, às 21:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefan Michael Geiger, Membro**, em 01/04/2022, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1352330** e o código CRC **44AC5624**.

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, com a participação dos seguintes colaboradores e órgãos de fomento:

COLABORADORES:

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG:

Prof^ª. Dr^ª. Daniella Castanheira Bartholomeu

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Lacerda Bueno

Dr. João Luís Reis Cunha

Dra. Vanessa Gomes Fraga

Samuel Alexandre Pimenta Carvalho

Jordânia Costa Pinto

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG): Bolsa de mestrado

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

DEDICAÇÃO

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus avós Dona Mercês e Senhor Assis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Cristina e José por sempre lutarem pela minha educação, pelo meu futuro, bem estar e felicidade. Por sempre me apoiarem, acreditarem em mim quando eu mesmo desacreditava e por nunca saírem do meu lado. Hoje sou o que sou e estou onde estou por causa de vocês.

Agradeço aos meus familiares por também me apoiarem. Principalmente aos meus avós por toda felicidade pelas minhas conquistas.

Agradeço ao meu melhor amigo Anderson, por estar do meu lado durante toda minha caminhada científica, desde a graduação. Apesar de toda dificuldade, sempre esteve comigo me dando palavras de apoio, me explicando conceitos e metodologias e principalmente me encorajando quando minhas forças se enfraqueciam. Sua amizade e presença são fundamentais para mim.

Agradeço às minhas amigas da turma de mestrado Laura, Anna e Giovanna que foram meus pontos de apoio durante o mestrado em meio à pandemia. Jamais me canso de repetir que sem a amizade e apoio de vocês, jamais conseguiria concluir esta etapa.

Agradeço ao meu companheiro, amigo e cúmplice Lucas por sempre deixar muito claro o quanto acredita em mim e que sou capaz de realizar tudo que me proponho a fazer. Obrigada pela paciência e por estar ao meu lado nas minhas angústias e felicidades.

Ao meu orientador Ricardo Fujiwara por ter me aceito como aluna e por ter acreditado no meu potencial. Muito obrigada por toda paciência, pelo investimento e confiança depositados em mim em meio às incertezas de um mestrado em meio à pandemia.

Agradeço à Lilian por ter me recebido no laboratório como aluna de iniciação científica. Por me ensinar sobre responsabilidade e dedicação no trabalho e nos estudos. Agradeço pelas inúmeras conversas e desabafos. Hoje estou defendendo o mestrado na linha de pesquisa que amo e grande parte devo isso à você, por ter acreditado em mim e me apoiado nas minhas escolhas.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) por todo apoio, ensino e paciência. Em especial à Luiza Padrão que cresceu profissionalmente junto comigo e por termos nos tornado apoio profissional uma da outra, compartilhando nossas inseguranças, dúvidas e alegrias no dia-a-dia. Obrigada pela sua amizade. À Michele por todo apoio, organização e conversas. Com certeza já deve estar cansada de saber, mas sem você nada aconteceria e à Vanessa por toda paciência me auxiliando e me ensinando.

Aos colaboradores do projeto. Em especial João, Vanessa, Jordânia e Marianna por todo apoio, paciência e auxílio.

Ao departamento de parasitologia. Em especial à Sumara, por toda sua paciência, prestatividade e carinho.

RESUMO

O trematódeo da espécie *Schistosoma mansoni* é o helminto causador da esquistossomose mansoni, uma das doenças tropicais negligenciadas que mais causa preocupação para a saúde pública, devido à prevalência de formas graves e o grande número de óbitos que ocorrem mundialmente. Atualmente o diagnóstico padrão utilizado e recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o método parasitológico de Kato-Katz, que apresenta bom desempenho em regiões de alta endemicidade. Porém, a baixa sensibilidade em regiões de endemicidades de baixa a moderada dificulta o diagnóstico e mascara a real prevalência do parasito, interferindo assim no tratamento dos indivíduos infectados e em seu controle. Desta forma, neste trabalho objetivamos selecionar alvos imunogênicos para o desenvolvimento de um teste rápido para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni*. Para isto, foram selecionadas sequências de peptídeos por bioinformática, pela análise de imunogenicidade e identidade e em seguida, através da técnica de immunoblotting foram analisados pool de soros de indivíduos infectados em idade escolar da área endêmica do Município de Januária no estado de Minas Gerais, pool de soros destes mesmos indivíduos 30 dias após o tratamento, pool de indivíduos não infectados de área não endêmica e pool de indivíduos infectados com outras espécies de helmintos que poderiam gerar possíveis reações cruzadas, sendo elas *Fasciola hepática*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis* e *Toxocara canis*. Sendo assim, foram selecionados 22 peptídeos reativos, onde 15 destes foram reativos para o grupo de soros de indivíduos infectados, 2 foram reativos para o grupo de indivíduos 30 dias após o tratamento e 5 peptídeos foram reativos para os dois grupos simultaneamente. A seleção e síntese destes peptídeos utilizados como base imunogênica na confecção de um teste rápido para o diagnóstico de *S. mansoni* torna-se bastante interessante, uma vez que combina um método sorológico altamente sensível com a facilidade de utilização em campo para a testagem em massa. Apresentando uma ótima perspectiva para o diagnóstico e como consequência, o eficiente tratamento e maior controle da infecção nas áreas endêmicas.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, Diagnóstico sorológico, Peptídeos, Teste rápido

ABSTRACT

The trematode of the species *Schistosoma mansoni* is a helminth that causes schistosomiasis mansoni, one of the tropical diseases that concern the public health, due to the prevalence of severe forms and the large number of deaths that occur worldwide. Currently, the standard diagnosis used and recommended by the World Health Organization (WHO) is the Kato-Katz parasitological method, which performs well in regions of high endemicity. However, its low sensitivity in studies of low to moderate endemic regions, makes the diagnosis difficult and masks the real prevalence of the parasite, thus interfering in the treatment of those infected and their control. Thus, in this work we aim to select immunogenic targets for the development of a rapid test for the diagnosis of *S. mansoni* infection. For this, sequences of peptides were selected by bioinformatics, by the analysis of immunogenicity and identity, and then, through the immunoblotting technique, pool of infected sera from school age children from an endemic area of the Municipality of Januária in the state of Minas Gerais, pool of sera from the same patients 30 days after treatment, , pool of non infected patients , and pool of sera from patients infected with other helminths, which would present possible cross-reactions to *S. mansoni*, such as *Fasciola hepatica*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis* e *Toxocaracanis*. Therefore, 22 infected reactive peptides were selected, 15 of these were reactive for the group of *S. mansoni* infected sera, 2 were selected for the group of patients 30 days after treatment and 5 peptides for both groups simultaneously. In short screening and immunogenic for baseline diagnosis, mansoni can produce a baseline test for a highly sensitive serological method with ease of use. Presenting us with a great perspective for diagnosis and, as a consequence, efficient treatment and greater infection control in endemic areas.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, Serological diagnosis, Peptides, Rapid test.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição mundial das espécies do gênero *Schistosoma* (pág. 15)
- Figura 2:** Distribuição da espécie *Schistosoma mansoni* no Brasil (pág. 16)
- Figura 3:** Ciclo de *S. mansoni* (pág. 18)
- Figura 4:** Conservação de sequência entre o peptídeo e o proteoma avaliado (pág. 33)
- Figura 5:** Revelação das reações das membranas de Immunoblotting (pág. 35)
- Figura 6:** Análise densitométrica dos peptídeos (pág. 36)
- Figura 7:** Diagrama de Venn dos peptídeos reativos (pág. 38)

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Número total de sequências de *S. mansoni* antes e após passarem pelos filtros de exclusão (pág. 32)

Tabela 2: Processo de remoção de peptídeos por filtragem (pág. 34)

Tabela 3: Peptídeos reativos para o grupo T0 (pág. 37)

Tabela 4: Peptídeos reativos para o grupo 30D (pág. 37)

Tabela 5: Peptídeos reativos para os grupos T0 e 30D simultaneamente (pág. 38)

Quadro 1: Espécies de helmintos que poderiam gerar possíveis reações cruzadas e seus respectivos proteomas (pág. 33)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.2. Patogenia.....	18
1.3. Controle.....	19
1.4. Diagnóstico.....	20
1.4.1. Kato-Katz.....	20
1.4.2. Diagnósticos Sorológicos.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Predição e seleção de epitopos de células B por biologia computacional.....	26
4.2. Síntese de peptídeos em membranas de celulose - Spot síntese.....	27
4.3. Comitê de ética.....	28
4.4. Painel sorológico.....	28
4.5. Imunoensaio com peptídeos ligados à membrana.....	29
4.6. Regeneração de membrana.....	30
4.7. Análise densitométrica.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Predição e seleção de epitopos de células B por biologia computacional.....	32
5.2. Imunoensaio com peptídeos ligados à membrana.....	34
5.3. Densitometria.....	35
6. DISCUSSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	43
8. ANEXOS.....	51
8.1 Anexo 1.....	51
8.2 Anexo 2.....	52
8.3 Anexo 3.....	53

1. INTRODUÇÃO

As helmintoses são consideradas doenças tropicais negligenciadas que apresentam um preocupante problema de saúde pública em escala mundial e, dentre elas, podemos destacar as esquistossomoses como uma das mais importantes (WHO, 2020). São causadas pelas espécies *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. malayensis* (GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, 2012; CHUAH et al., 2019), sendo endêmicas nos continentes Sul-americano, Asiático e Africano, totalizando aproximadamente 76 territórios acometidos pelo gênero (ENGELS et al., 2002). A distribuição das espécies do gênero *Schistosoma* pode ser evidenciada na **Figura 1**.

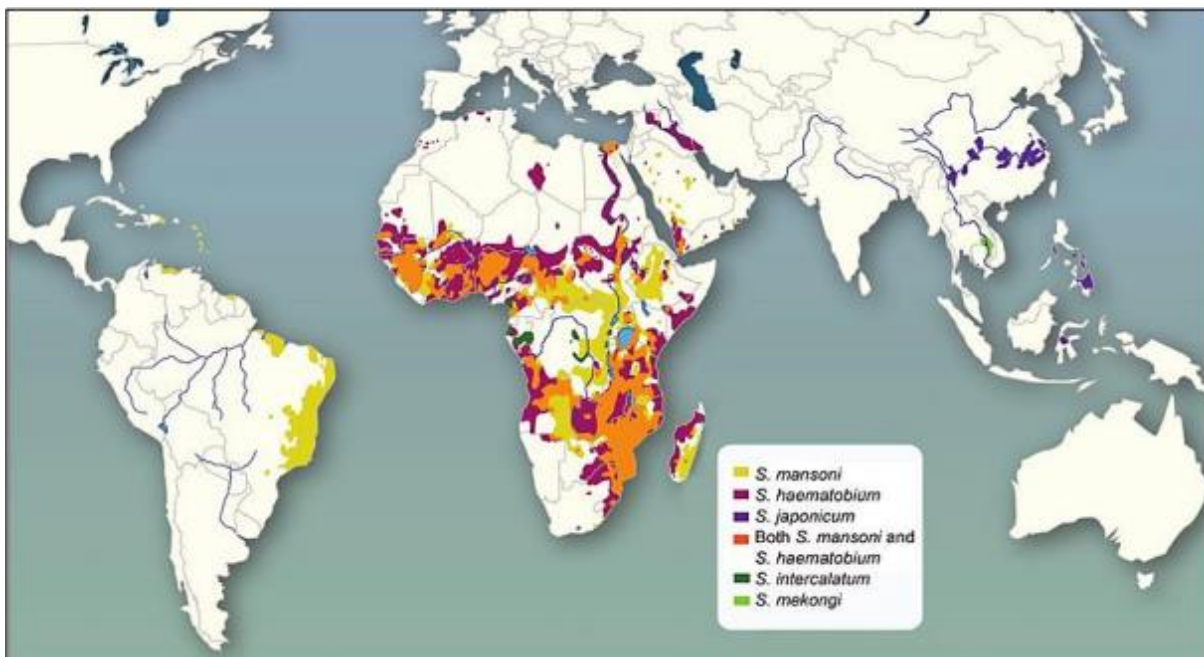


Figura 1: Distribuição mundial das espécies do gênero *Schistosoma*. (Fonte: x).

É estimado que, no mundo, aproximadamente 240 milhões de pessoas estejam infectadas com as esquistossomoses sendo que, dessas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões apresentam a forma grave da doença (CHITSULO et al., 2000; SINGH SAHARAN; MEHTA; MEENA, 2016). As esquistossomoses estão apenas atrás da malária quando avaliada a importância socioeconômica, sendo considerada a terceira doença mais frequente e que causa grande preocupação no Sistema de Saúde Pública (WHO, 2002).

No Brasil, a esquistossomose é causada exclusivamente pela espécie *Schistosoma mansoni*. Dezenove estados são considerados endêmicos para a esquistossomose mansônica, com um total de aproximadamente 25 milhões de pessoas vivendo nessas áreas, estando localizados principalmente na região Nordeste do país, Minas Gerais e Espírito Santo. Já nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo e nas regiões Norte e Sul do país, a transmissão da infecção possui um perfil de caráter focal e disperso (NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014; COLLEY; SECOR, 2014; CARVALHO et al., 2018). Dados realizados através de inquéritos coproscópicos, observados na **Figura 2**.

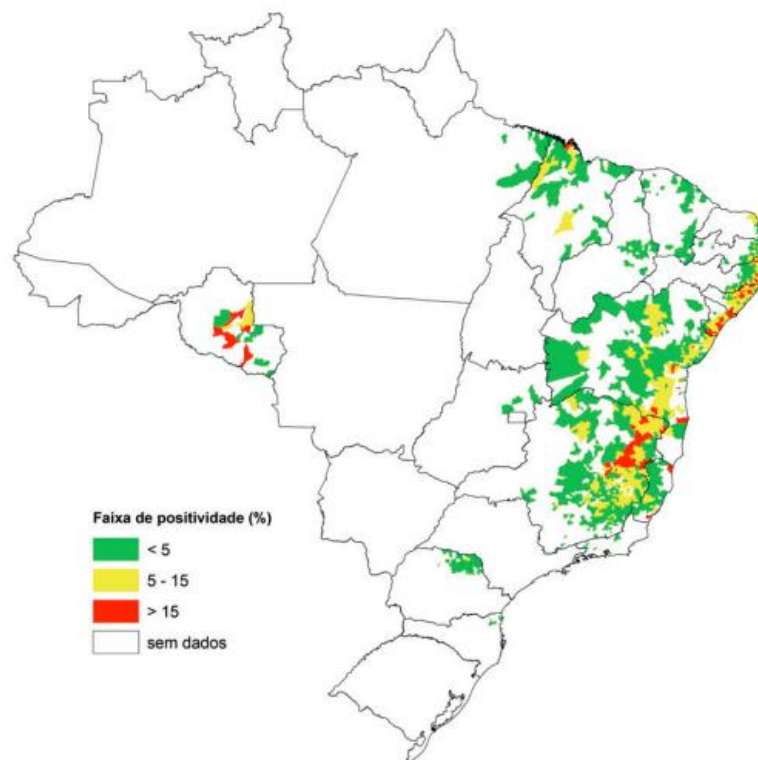


Figura 2: Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil (Fonte: DO AMARAL et al., 2006).

1.1 Schistosoma mansoni

Conhecida popularmente como Bilharziose, Xistose, Xistosa, Doença dos Caramujos e Barriga d'Água, a esquistossomose mansônica é uma doença causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*, que possuem como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria* (MS, 2014). Seu ciclo se inicia através do contato de fezes humanas com presença de ovos do parasito com coleções hídricas de água doce. Estes ovos irão eclodir, liberando assim os miracídios, que através de sua cutícula com presença de inúmeros cílios, irão nadar livremente em busca do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria* sp., dando então

continuidade ao ciclo (MS, 2014). Aproximadamente 48 horas após a penetração no hospedeiro o miracídio tem sua mobilidade perdida, se transformando em esporocisto primário, cujas células germinativas se multiplicam e dão origem a esporocistos secundários, que posteriormente se transformam em cercárias (WHO, 2016). As cercárias então abandonam o invertebrado e através dos movimentos sua cauda, irão nadar de forma livre no ambiente aquático em busca do ser humano, hospedeiro definitivo, e ao encontrá-lo, penetrará em sua pele de forma ativa (TEFERA; BELAY; BAJIRO, 2020). Ao penetrarem perdem sua cauda bifurcada, se transformando em formas larvais conhecidas como esquistossômulos, que irão entrar na circulação através de capilares ou pela circulação linfática no hospedeiro. Através da artéria pulmonar, migram para o pulmão (CHEEVER et al., 2002), sendo que muitos ficam retidos nos capilares pulmonares e os que conseguem manter a migração, são transportados para o coração e assim para a circulação venosa (WEERAKOON et al., 2015). Quando chegam ao sistema porta hepático, os esquistossômulos passam por maturação sexual, se diferenciando em verme adulto macho e fêmea separadamente. Após a maturação sexual, os parasitos migram para as veias mesentéricas do intestino, onde ocorre a cópula. Em aproximadamente 5 semanas após a infecção, ocorre então a oviposição da fêmea, sendo que, após o ocorrido os ovos migram através dos tecidos até chegarem ao lúmen do intestino grosso, onde serão excretados juntamente das fezes do ser humano. Podendo ser observado na **Figura 3** (MCMANUS et al., 2018).

A manutenção da esquistossomose mansoni no Brasil se dá através de alguns fatores, como a falta de saneamento básico ou sua presença inadequada, nível socioeconômico, ocupação, modo de lazer, grau de educação e informação da população exposta ao parasito, quando se relacionam, favorecem a sua transmissão e conseqüentemente a sua instalação nestas respectivas localidades (MS, 2014).

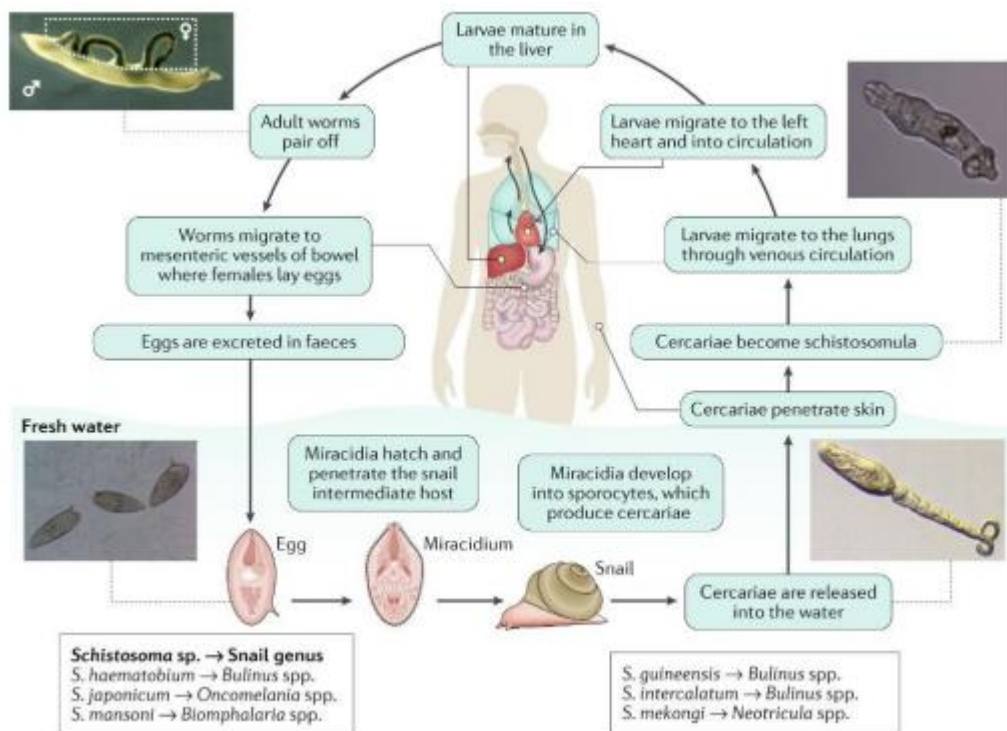


Figura 3: Ciclo *Schistosoma mansoni* (Fonte: MCMANUS et al., 2018).

1.2 Patogenia

A patogenia da esquistossomose mansônica pode ser classificada em duas fases, a fase água e a fase crônica da infecção (MS, 2014). A fase aguda sintomática que também pode ser conhecida como Síndrome de Katayama, é caracterizada pela migração dos esquistossômulos e pelo início da oviposição, resultando em uma grande sensibilidade sistêmica no indivíduo infectado. Esta fase é mais comumente identificada em indivíduos com infecção primária em regiões não endêmicas. Já os indivíduos das regiões endêmicas geralmente não são diagnosticados (LAMBERTUCCI, 1993). Os sintomas observados da síndrome são febre aguda acompanhada de quadros inflamatórios pulmonares e abdominais (BOTTIEAU et al., 2006). Podem ser observadas também manifestações cutâneas, caracterizadas pela penetração da cercária na pele do indivíduo, conhecida como Dermatite Cercariana (MS, 2014).

A fase crônica pode ser observada de várias formas, sendo caracterizada de acordo com o órgão mais acometido na infecção. As formas podem ser hepatointestinal ou hepática, com o desencadeamento de fibrose periportal sem esplenomegalia; hepatoesplênica, ocasionando fibrose periportal com esplenomegalia. A doença pode se manifestar também em formas complicadas, que podem ser vasculopulmonar, glomerulopática, neurológica, pseudoneoplásica e linfoproliferativa (MS, 2014). As principais lesões observadas nessa fase

se devem principalmente aos ovos que ficam presos nos tecidos durante as migrações. Estes ovos secretam enzimas para impedir a necrose do tecido lesado, porém acabam desencadeando reações inflamatórias e granulomatosas, que posteriormente são substituídas por depósitos fibróticos, responsáveis pelos sintomas da doença (COLLEY; SECOR, 2014).

1.3 Controle

Alguns programas já foram implementados no país a fim de controlar a doença. Houveram dois inquéritos considerados como marcos históricos que foram importantes na luta contra a esquistossomose mansônica. O primeiro inquérito foi realizado tanto para esquistossomose quanto para as geohelmintoses, executado pela Divisão de Organização Sanitária do Ministério de Educação e Saúde, entre os anos de 1947 a 1952, sendo coordenado pelos sanitaristas Pellon e Teixeira, que permitiu o mapeamento da doença no País (KATZ, 2018). A superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM, do Ministério da Saúde, efetuou o segundo levantamento nacional, exclusivo para esquistossomose mansoni, que utilizou como método diagnóstico o exame de Kato-Katz. Auxiliando assim, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose - PECE a delimitar os limites de área para sua atuação e a direcionar e aplicar as devidas medidas de controle (KATZ, 2018). Em 1975 o PECE iniciou suas atividades, após a criação de drogas consideradas mais seguras e eficazes para o tratamento da doença. O programa teve como estratégias de controle a identificação e o tratamento adequado dos indivíduos infectados por *S. mansoni*, juntamente com a vigilância e o controle dos hospedeiros intermediários. Na década de 1980 o PECE dispunha de recursos do governo federal e posteriormente foi descentralizado e redistribuído, se tornando responsabilidade municipal, tendo seu nome alterado para Programa de Controle da Esquistossomose – PCE (DO AMARAL et al., 2006). Desde a implementação de tais programas, foram observados impactos sobre a prevalência e a intensidade das infecções na população das áreas endêmicas, o que consequentemente diminuiu as formas graves e as mortes causadas pela doença (MS, 2014). Um dos métodos existentes para o controle da infecção por *S. mansoni* é a realização do controle dos hospedeiros intermediários através da utilização de drogas moluscidas. Atualmente a droga comercialmente utilizada e recomendada pela Organização Mundial de Saúde para tal método de controle é a niclosamida (CAWSTON, 1945). Porém, foi observado que a niclosamida tem apresentado certos níveis de toxicidade para outros animais que não fazem parte do foco do controle, sendo considerado um método limitado, necessitando assim de novos estudos a fim de se aprimorar o controle de tais hospedeiros (RAPADO et al., 2013).

Outro método utilizado para o controle é a realização do devido tratamento dos indivíduos positivos. O fármaco atualmente utilizado e recomendado para o controle da esquistossomose mansônica em todo o mundo, segundo a Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde é o praziquantel (BARROS, 2020; FERRARI et al., 2003), que age atuando principalmente contra as formas adultas do parasito, sendo menos responsivo para as formas larvais e apresenta grande eficácia nas formas clínicas da doença (CHAI, 2013). Este medicamento age interferindo no influxo de cálcio pelo parasito, o paralisando e conseqüentemente o eliminando do organismo do indivíduo (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008). A oximniquina também é um fármaco para o tratamento de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, mas atualmente não se faz mais seu uso devido à menor eficácia quando comparado ao PZQ, além de causar mais efeitos colaterais nos indivíduos que o utilizam; sua escolha como método de tratamento é restrita em casos de indivíduos que apresentam resistência ao PZQ (FALLON, P. G., DOENHOFF, M. J., 1994; COLES, 2002). Esta medida de controle por quimioterapia, apesar de levar à cura dos indivíduos infectados, não previne respectivas reinfecções. Sendo que, os indivíduos reinfecidos geralmente apresentam uma diminuição na carga parasitária. Levando assim à uma maior dificuldade no diagnóstico através do KK e conseqüentemente menor elucidação do número total de casos nas regiões endêmicas (BLANTON et al., 2015; SILVA-MORAES et al., 2019).

Para que se obtenha um desejável nível de controle do parasito e de sua doença relacionada é necessário a elucidação da população em relação à infecção, investindo assim na educação em saúde e infraestrutura, como melhoria do saneamento básico. Podemos citar também a delimitação das áreas endêmicas para que seja possível focar nestas localidades. Porém, assim como o tratamento só é possível que estas medidas sejam colocadas devidamente em prática após a realização correta do diagnóstico (MS, 2014).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Kato-katz

O método padrão escolhido pela Organização Mundial de Saúde utilizado para o diagnóstico de *S.mansoni* é o exame parasitológico conhecido como Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972; FELDMEIERS; POGGENSEE, 1993), sua escolha se deve ao fato de apresentar uma boa sensibilidade na detecção dos ovos do parasito nas amostras de fezes dos indivíduos analisados, possui um baixo custo monetário e é de fácil execução em campo e em larga escala. Por ser um exame parasitológico que permite a visualização e a contagem dos

ovos do parasito por gramas de fezes, é considerado como um indicador quantitativo para se avaliar a intensidade da infecção nos indivíduos e com isso consequentemente se torna possível estimar a infecção nas determinadas regiões onde se encontram (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Entretanto, o nível de sensibilidade observado neste método, não se mostra totalmente satisfatório quando realizado em indivíduos que apresentam menor quantidade de ovos nas fezes, estando relacionado ao nível de endemicidade do local analisado. Além de apresentar variação de acordo com a quantidade de lâminas examinadas por indivíduo (UTZINGER et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2011). Dessa forma, com o uso do Kato-Katz como teste único e padrão em áreas endêmicas, não se torna possível estimar a real prevalência da doença em determinadas localidades e como consequências, pode-se observar a defasagem no tratamento para o total de indivíduos infectados da população (DE VLAS; GRYSEELS, 1992). Esta defasagem na detecção de infecções de baixa carga parasitária gera grande grau de preocupação, pois por mais que não levem à patologia grave da doença, elas podem ser responsáveis pela continuação de sua transmissão. Além de serem capazes de gerar confusão em posteriores inquéritos, podendo surgir como novos casos, criando então uma maior dificuldade na compreensão e controle da doença (GONÇALVES et al., 2005).

A sensibilidade do método Kato-Katz só apresenta um nível de maior confiabilidade quando se utiliza um maior número de lâminas por amostra de fezes, juntamente com a utilização de outros testes diagnósticos, como o Helmintex ou teste rápido de urina - POC-CCA, por exemplo (OLIVEIRA et al., 2018).

1.4.2 Diagnósticos sorológicos

Devido à grande limitação no atual método diagnóstico e os impactos que esta causa à saúde pública e à vida dos indivíduos expostos, é de grande importância a realização de estudos para a criação e aprimoramento de novos métodos. Métodos que utilizam a sorologia como uma nova alternativa, quando comparados aos tradicionais parasitológicos, tem se mostrado como ferramentas mais sensíveis para o diagnóstico de *S.mansoni*, principalmente quando avaliados nas regiões consideradas de baixa endemicidade para o parasito (GONÇALVES et al., 2006; MCLAREN et al., 1981; ESPIRITO-SANTO et al., 2014). O imunodiagnóstico baseado na síntese de peptídeos, que são utilizados como base antigênica para o diagnóstico laboratorial de *S. mansoni* obtiveram resultados satisfatórios quanto a sensibilidade e especificidade na detecção de parasitos em indivíduos infectados (DE OLIVEIRA et al., 2006; VLAMINCK et al., 2021; CARVALHO et al., 2017). Estes peptídeos são identificados e caracterizados através

da predição de epitopos de células B por biologia computacional e posteriormente sintetizados para a realização do imunodiagnóstico. Esta técnica consiste na interdisciplinaridade entre as áreas de bioinformática, biologia celular e imunologia, o que torna seus resultados mais específicos e promissores (WINKLER; CAMPBELL, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2008). A sorologia tem apresentado resultados animadores, além de ser uma técnica bastante inovadora. Porém, sua utilização ainda não se torna totalmente viável principalmente por apresentar a necessidade de grande estrutura laboratorial e por possuir difícil aplicabilidade em larga escala, fazendo com que a sua utilização em campo se torne um desafio. A junção de um teste sorológico que possua alta sensibilidade e especificidade e que apresente praticidade e facilidade de seu uso em campo, gera grande entusiasmo numa perspectiva para o diagnóstico e controle da esquistossomose (DAWSON et al., 2013).

Diante da vasta complexidade relacionada ao parasito e sua biologia, seu controle e prevenção devem ser realizado pela integração de várias ações implementadas através de políticas de saúde pública, podendo ser citadas o saneamento básico digno às pessoas diariamente expostas, educação em saúde da população, maior controle e vigilância dos moluscos hospedeiros e principalmente o correto diagnóstico e o respectivo tratamento de indivíduos infectados (MS, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar e selecionar potenciais alvos que sejam candidatos ao reconhecimento de anticorpos de *Schistosoma mansoni* com a finalidade de desenvolver testes sorológicos para o diagnóstico e controle do trematódeo.

2.2. Objetivos específicos

Identificar e selecionar sequências de peptídeos de *S. mansoni* por bioinformática, pela análise de imunogenicidade e identidade;

Sintetizar em membrana de celulose as sequências dos peptídeos identificadas de *S. mansoni*;

Determinar o padrão de reconhecimento sorológico os peptídeos selecionados através da técnica de immunoblotting;

3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, 19 Estados são considerados endêmicos para a esquistossomose mansoni, com um total de 25 milhões de pessoas vivendo nessas áreas, sendo que, a maioria destes estados está localizada na região Nordeste do país (NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014). Atualmente o método padrão escolhido pela Organização Mundial de Saúde utilizado para o diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* é o exame parasitológico de fezes conhecido como Kato-Katz (FELDMEIER; POGGENSEE, 1993). Este teste possui sensibilidade limitada, principalmente quando realizado em indivíduos que apresentam pouca quantidade de ovos nas fezes. Seu desempenho está relacionado com o nível de endemicidade do local analisado, além de apresentar variação de acordo com a quantidade de lâminas examinadas por indivíduo (UTZINGER et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2011). A sensibilidade deste método só apresenta um nível de maior confiabilidade quando se utiliza um maior número de lâminas por amostra de fezes, além da utilização conjunta com outros testes diagnósticos, como o Helmintex ou teste rápido de urina - POC-CCA, sendo inviável devido ao aumento da mão de obra e custo com estes testes adicionais (OLIVEIRA et al., 2018).

Métodos que utilizam a sorologia como uma nova alternativa, quando comparados aos parasitológicos, tem se mostrado como ferramentas mais sensíveis para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, principalmente quando avaliados nas regiões consideradas de baixa endemicidade para o parasito (GONÇALVES et al., 2006; MCLAREN et al., 1981; ESPIRITO-SANTO et al., 2014). Como exemplo, temos o imunodiagnóstico baseado no uso de sequencias peptídicas, que são utilizadas como base antigênica para o diagnóstico laboratorial da infecção por *S. mansoni* (DE OLIVEIRA et al., 2006; VLAMINCK et al., 2021; CARVALHO et al., 2017). A interdisciplinaridade entre as áreas de bioinformática, biologia celular e imunologia, permite o planejamento de resultados mais específicos e ainda mais promissores (WINKLER; CAMPBELL, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2008). Devido a defasagem do método diagnóstico atualmente utilizado e o impacto que a infecção causa na população e na saúde pública, é considerado de extrema importância o desenvolvimento de novas alternativas de um método diagnóstico que apresente alta sensibilidade, especificidade, inovação e tecnologia, com a praticidade e facilidade para que possa ser utilizado em campo e em larga escala. Sendo assim, o presente trabalho contribuiria com a seleção e validação de potenciais alvos imunogênicos, para o desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico de indivíduos com *S. mansoni*, aumentando assim a capacidade de controle do parasito no país e

até mundialmente, mudando e também aumentando as perspectivas na área de diagnósticos de doenças tropicais negligenciadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Predição e seleção de epitopos de células B por biologia computacional

Através do banco de dados WormBase, foi utilizado o proteoma de *Schistosoma mansoni* de ID *schistosoma_mansoni.PRJEA36577*. Através de ferramentas de bioinformática desenvolvidas no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), o proteoma de referência utilizado passou por um filtro para remover sequências mal anotadas e confusas, para que se obtenha dados com maior grau de confiabilidade. Este filtro excluiu sequências que não comecem com ATG; sequências que não terminam com stop códon; sequências com menos de 100 aminoácidos e sequências que apresentem “X” como aminoácido. Após a filtragem, as sequências passaram por uma seleção de peptídeos, baseada no score de predição de células B, que seleciona os peptídeos com maior score de ranqueamento e imunogenicidade, através do software Immunorank (dados não publicados), desenvolvido por pesquisadores do LIGP. A seguir, cada peptídeo selecionado anteriormente passou por uma análise de BLASTp contra o proteoma de espécies de outros helmintos que poderiam gerar reações cruzadas, confundindo as análises futuras, sendo elas: *Fasciola hepatica*; *Taenia solium*; *T. saginata*; *Hymenolepis nana*; *H. diminuta*; *Ascaris suum*; *A. lumbricoides*; *Ancylostoma duodenale*; *Necator americanus*; *Trichuris trichiura*; *Enterobius vermicularis*; *Strongyloides stercoralis* e *Toxocara canis*.

Após realizada a análise, as sequências resultantes foram submetidas a 3 etapas de remoção de peptídeos: **1a.** Remoção de peptídeos que apresentaram Identidade X Cobertura acima de 6.000 com qualquer uma destas espécies de helmintos citadas acima; **2a.** Remoção de peptídeos repetitivos e **3a.** Remoção de peptídeos redundantes, removendo o peptídeo de menos score se tiver alta similaridade com outro peptídeo. Finalmente, os peptídeos que foram selecionados através de todos estes filtros, foram então sintetizados através da técnica de Spot síntese, para posteriores análises.

4.2. Síntese de peptídeos em membranas de celulose - Spot síntese

Os peptídeos que foram selecionados pela predição e seleção de células B, foram sintetizados em uma membrana de celulose, através de um sintetizador automatizado (Intavis, Alemanha). A membrana é produzida de forma com que ela já apresente grupos carboxila livres em cada spot, o que possibilita a ancoragem de um novo aminoácido, dando assim início à síntese dos peptídeos (FRANK, 1992; KUDITHIPUDI et al., 2014). O plano de distribuição dos aminoácidos e a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos foram definidos através do programa de computação Multipeps. Sobre a membrana de celulose, os grupos hidroxila livres serviram como ponto inicial para que possibilitasse o início da síntese dos peptídeos. Estes grupos foram então acoplados por ligação estável com 8 a 10 unidades de etileno glicol (Intavis AG), que possuem a finalidade de afastar o peptídeo do suporte, conferindo assim uma melhor estabilidade na ligação do peptídeo à membrana de celulose. A síntese dos peptídeos se inicia sempre pelo C-terminal do último aminoácido da sequência estabelecida. Inicialmente, os resíduos de aminoácidos 9- fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) foram ativados através da adição de diisopropilcarboidimida (DIC) e Oxyma em meio de N-metil-pirrolidona (NMP) e anidrido acético 3%. Após a inserção do Fmoc e compostos a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Passada a reação, o próximo passo foi a desproteção dos grupos N-terminal protegidos por Fmoc, através da adição de piperidina a 20% em DMF (LAUNE et al., 2002), tendo assim as funções aminas recuperadas. Os aminoácidos em seguida foram ativados por DIC/HOBT (150 µl cada aminoácido) e depositados para que se torne possível reiniciar um próximo ciclo de síntese. As funções NH₂ livres ou as que não apresentaram reação foram acetiladas (anidrido acético 10% em DMF) para assim evitar a formação de peptídeos errados ou outras ligações indesejáveis. Ao final da realização da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos foram desprotegidos pela adição de ácido trifluoracético (TFA), seguida da adição do reagente scavenger (“limpador”) tri-isopropilsilano (TIPS) para evitar o ataque dos resíduos aos peptídeos sintetizados, associado a diclorometano e trietilsilano, para que os peptídeos pudessem permanecer fixos de forma covalente sobre a membrana (KRAMER; SCHNEIDER-MERGENER, 1998). Foi gerada então uma membrana com o total de 422 peptídeos.

4.3. Comitê de ética

Os procedimentos e utilização de amostras de humanos infectados e não infectados por *S.mansoni* deste projeto foram aprovados pelo CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) sob o número de protocolo CAAE: 63621316.4.0000.5149 (**ANEXO 1**).

Já as amostras de soros humanos e animais para os outros nematódeos foram aprovadas para uso pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG, respectivamente, COEP sob nº CAAE: 61101916.0.0000.5149 e CEUA sob nº 368/2018 (**ANEXO 2**).

Os soros de camundongos (linhagem BALB/c) infectados experimentalmente por *Strongyloides venezuelensis*, foram doados pelo Laboratório de Esquistossomose e Imunologia de Helminhos, ICB/UFMG. Essas amostras de soros humanos e animais foram aprovadas para uso pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG, respectivamente, COEP sob nº CAAE: 61101916.0.0000.5149 e CEUA sob nº 368/2018 (**ANEXO 3**).

4.4. Painele sorológico

Foram utilizados neste estudo pool de soros de humanos não infectados de área não endêmica para *S. mansoni*; pool de soros de humanos infectados por *S. mansoni* de área endêmica; pool de soros destes mesmos indivíduos infectados 30 dias após a realização do tratamento padrão; pool de soros de humanos e animais infectados com *A.lumbricoide*s, *T. trichiura*, *A. duodenale*, *N. americanus* e *S. venezuelensis*, sendo essa última espécie o modelo experimental utilizado para estudo da biologia e infecção por *S. stercoralis*. As amostras de soros humanos fazem parte do banco de soros do LIGP, ICB/UFMG, já os soros de camundongos (linhagem BALB/c) infectados experimentalmente por *S. venezuelensis*, foram doados pelo laboratório de Esquistossomose e Imunologia de Helminhos, ICB/UFMG. O critério de inclusão das amostras de soros de indivíduos infectados por *S. mansoni* foi a positividade de suas respectivas amostras de fezes no exame parasitológico de Kato-Katz, assim como para POC-CCA utilizado como método adicional. O critério foi o mesmo para os soros negativos de indivíduos de áreas não endêmicas. Já a positividade para os outros nematódeos se deu pelas técnicas parasitológicas de Sedimentação espontânea (LUTZ, 1919), Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) e Baermann-Morais (MORAES, 1948). A amostra foi considerada positiva quando

detectada a presença de formas evolutivas dos parasitos por qualquer uma das técnicas, menos pelo POC-CCA.

Sendo assim, foram utilizados Pool de soros de 10 indivíduos infectados com *S. mansoni*, residentes do município de Januária/MG, região endêmica para o parasito, confirmados através do exame de Kato-Katz + POC-CCA; Pool de soros destes mesmos indivíduos 30 dias após a realização do tratamento padrão; Pool de soros de indivíduos não infectados, de área não endêmica. Para a confirmação da não infecção, foram realizados exames parasitológicos para comprovar que estes indivíduos realmente estavam negativos e Soros de indivíduos infectados com Ancilostomídeos, *Strongyloides* sp. *Ascaris* sp., e *Trichuris* sp., para a avaliação de possíveis reações cruzadas.

4.5. Imunoensaio com peptídeos ligados à membrana

Após realizada a síntese, as membranas contendo os peptídeos de interesse passaram por um imunoensaio a fim de analisar sua sensibilidade e especificidade com o pool de soros de indivíduos infectados de áreas endêmicas, o pool de soro de indivíduos não infectados de área não endêmica e o pool de soros para possíveis reações cruzadas, ambos confirmados por técnicas parasitológicas de diagnóstico (TOWBIN; GORDON, 1984).

No recipiente de execução do imunoensaio, a membrana contendo os spots selecionados e sintetizados foi incubada com 50 mL de solução de bloqueio (BSA – Fitzgerald Industries International U.S.A. 5% p/v e sacarose 4% p/v em PBS 1x) sob agitação por 12-16 horas. Logo após, a membrana passou por 3 lavagens com 100 mL de solução de lavagem (PBS 1x com Tween 20 0,1% v/v), sob agitação, durante 10 minutos cada e posteriormente foi incubada com o pool de soros diluído na mesma solução, onde permaneceu sob agitação por 2 horas. Realizada a incubação, a membrana passou por outras 3 lavagens com 100 mL de solução de lavagem, sob agitação durante 10 minutos cada e posteriormente foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:10000 que também foi diluído na mesma solução em 20 ml, sob agitação com duração de 1 hora. Passado o tempo de incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes com 100 mL de solução de lavagem, sob agitação rápida durante 10 minutos cada. Feita a última lavagem, a membrana foi transferida para a bandeja do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000, onde a reação foi revelada pelo método de

quimioluminescência após adição do substrato LuminataForte™ (Immobilon Forte Western HRP substrate). Realizada a revelação, a membrana foi lavada com 100 mL de solução de lavagem por 1 minuto, sob agitação rápida. Após a revelação, foi iniciado o protocolo de regeneração da membrana.

4.6. Regeneração de membrana

Após realizado o imunoenensaio, a membrana passou por um tratamento de regeneração para que seja possível sua reutilização em posteriores análises daqueles peptídeos nela sintetizados. Este processo consiste na remoção de todos os anticorpos que foram ligados a ela anteriormente. Primeiramente, a membrana passou por 3 lavagens de 10 minutos cada, com dimetilformamida (DMF). Após realizada a lavagem, a membrana foi incubada por 12 a 16 horas em solução desnaturante (Uréia - Fmaia a 8M + SDS NEON a 1% + 0.1% de 2-mercaptoetanol – MERCK-Schuchardt) para remoção dos complexos moleculares ligados aos peptídeos. Posteriormente, ela passou por outras 3 lavagens de 10 minutos cada, com uma solução ácida (50% de etanol + ácido acético a 10% + 40% de água deionizada). Após as lavagens, a membrana foi mantida em temperatura ambiente em uma capela de exaustão até ficar completamente seca. Posteriormente foi devidamente armazenada e mantida a 4°C para a conservação de seus peptídeos, permitindo assim sua reutilização para futuras análises (RAMADA et al., 2013).

4.7. Análise densitométrica

Após o teste de reatividade pelo immunoblotting, a membrana foi submetida à análise de cada spot, realizado pelo Software ImageJ e a sua extensão “ProteinArrayAnalyzer”. Além dos dados de densitometria, foram obtidas também imagens dos spots em escala colorimétrica, permitindo assim uma fácil visualização da reatividade de cada spot. Possibilita também a visualização do valor da reatividade de cada peptídeo, que serão utilizados para análises estatísticas e determinação do valor limite (cut-off) para seleção dos peptídeos mais reativos (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2005).

Para analisar cada peptídeo, primeiramente foi definido um valor limite (cut-off) de reatividade para se afirmar se um peptídeo é reativo ou não. O cálculo desse cut-off foi feito com o valor

da média da reatividade de todos os spots na membrana do controle negativo mais 3 vezes o desvio padrão destes mesmos spots (Média + 3*Desvio Padrão). Este valor foi aplicado tanto na membrana do controle negativo (CN), onde os peptídeos não podem ser mais reativos que o cutoff (peptídeos \leq cutoff), como nas membranas de soros positivos (T0 e 30D), onde os peptídeos devem ser mais reativos que o cutoff (peptídeos \geq cutoff). Para a membrana de soro diferencial, o de reação cruzada (RC), seus peptídeos não devem ser reativos com os peptídeos da membrana de soros positivos. O cálculo de cut-off utilizado para a membrana RC, foi o mesmo utilizado para a de controle negativo (peptídeos \leq média + 3*desvio padrão da reação cruzada).

Sendo assim, os critérios utilizados para a seleção dos melhores peptídeos foram:

1. Exclusão dos peptídeos reativos com controle negativo (peptídeos CN \leq cutoff CN);
2. Exclusão dos peptídeos reativos com reação cruzada (peptídeos RC \leq cutoff RC);
3. Seleção dos peptídeos reativos para T0 (peptídeos T0 \geq cutoff CN);
4. Seleção dos peptídeos reativos para T0-30 dias (peptídeos 30D \geq cutoff CN);
5. Verificação de possível existência de peptídeos reativos para T0 e T0-30 dias ao mesmo tempo.

5. RESULTADOS

5.1. Predição e seleção de epitopos de células B por biologia computacional

O proteoma utilizado de ID *schistosoma_mansoni.PRJEA36577*, obtido através do banco de dados WormBase, passou por um filtro de exclusão a fim de se evitar sequências mal anotadas ou que possam gerar algum tipo de confusão. Este filtro excluiu sequências que não comecem com ATG; sequências que não terminam com stop códon; sequências com menos de 100 aminoácidos e sequências que apresentem “X” como aminoácido, removendo praticamente metade do proteoma predito.

Conforme a **Tabela 1**, o proteoma utilizado de *S. mansoni* possuía um total de 14499 sequências peptídicas e após passar pelos filtros de exclusão obtivemos um total de 8308 sequências.

Tabela 1: Número total de sequências de *S. mansoni* antes e após passarem pelos filtros de exclusão.

FILE	TOTAL	FILTRADOS
<i>S. mansoni</i>	14499	8308

Após a filtragem, as sequências passaram por uma seleção de peptídeos, baseada no score de predição de células B, que seleciona os peptídeos com maior score de ranqueamento e imunogenicidade, através do software Immunorank, que foi rodado para reportar 10000 peptídeos. A seguir conforme a **Figura 4**, cada peptídeo selecionado passou por uma análise de BLASTp, onde foi analisada a conservação de sequência entre os peptídeos analisados contra o proteoma de espécies de outros helmintos que poderiam gerar reações cruzadas, confundindo as análises futuras. Onde, as espécies de helmintos e seus respectivos proteomas podem ser observados no **Quadro 1**.

Quadro 1: Espécies de helmintos que poderiam gerar possíveis reações cruzadas e seus respectivos proteomas obtidos através do WormBase.

ESPÉCIE	IDENTIFICAÇÃO DO PROTEOMA
<i>Fasciola hepatica</i>	fasciola_hepatica.PRJEB25283
<i>Taenia solium</i>	taenia_solium.PRJNA170813
<i>T. saginata</i>	taenia_saginata.PRJNA71493
<i>Hymenolepis nana</i>	hymenolepis_nana.PRJEB508
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ascaris_lumbricoides.PRJEB4950
<i>A. suum</i>	ascaris_suum/PRJNA62057
<i>Ancylostoma duodenale</i>	ancylostoma_duodenale.PRJNA72581
<i>Necator americanus</i>	necator_americanus.PRJNA72135
<i>Enterobius vermicularis</i>	enterobius_vermicularis.PRJEB503
<i>Strongyloides stercoralis</i>	strongyloides_stercoralis.PRJEB528
<i>Toxocara canis</i>	toxocara_canis.PRJEB533

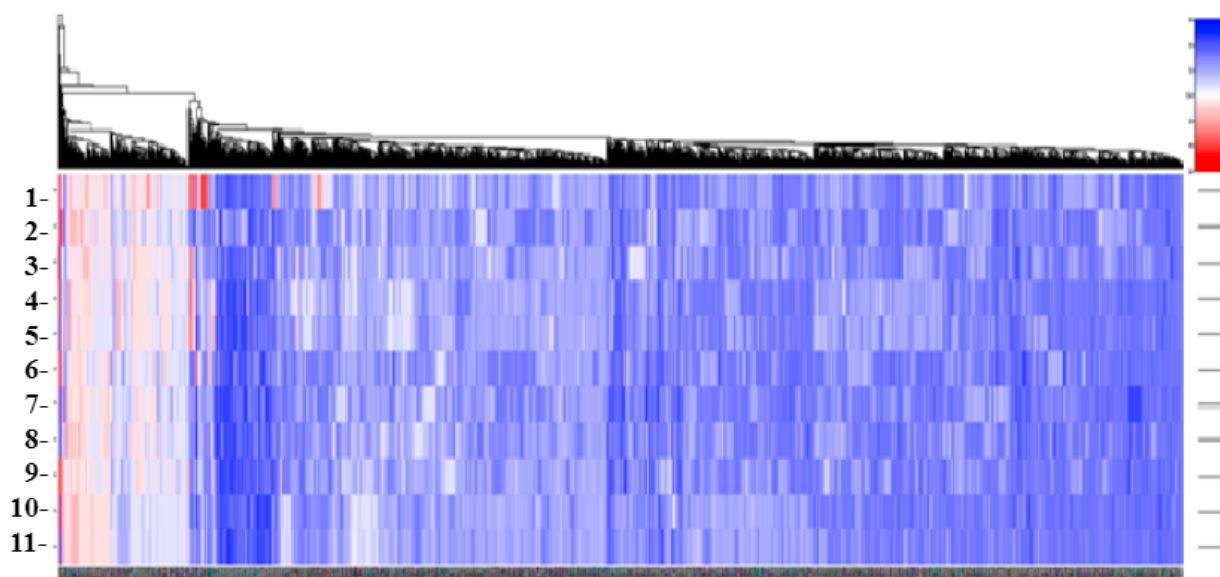


Figura 4: Nesta figura valor de cada célula representa a conservação de sequência entre o peptídeo e os proteomas avaliados. Este valor é dado pela multiplicação da Identidade e Cobertura do BLAST, indo de “0” (totalmente diferente) até 10.000 (idêntico). Neste gráfico, Azul = 4.000; branco = 7.000 e

vermelho = 10.000. A ordem das amostras, de cima para baixo, é: **1-** *F. hepatica*, **2-** *S. stercoralis*, **3-** *H. nana*, **4-** *T. solium*, **5-** *T. saginata*, **6-** *E. vermicularis*, **7-** *A. duodenale*, **8-** *N. americanus*, **9-** *T. canis*, **10-** *A. suum* e **11-** *A. lumbricoides*.

A partir desta análise de BLASTp, pode-se observar na **Tabela 2** que foram realizadas 3 etapas de remoção de peptídeos indesejados em relação a cada um dos 11 proteomas analisados e através de tal análise, com início de 10000 sequências, foram obtidos ao final um total de 442 peptídeos restantes para então se iniciar as análises imunológicas.

Tabela 2: Processo de remoção de peptídeos por filtragem e relação ao proteoma de outros helmintos.

ETAPA DE REMOÇÃO	Nº PEPTÍDEOS REMOVIDOS	TOTAL DE PEPTÍDEOS RESTANTES
Remoção de peptídeos que apresentaram Identidade X Cobertura acima de 6.000 com qualquer uma das 11 espécies de helmintos	9180	820
Remoção de peptídeos repetitivos	47	773
Remoção do peptídeo de menor score, quando possui alta similaridade com outro peptídeo	331	442

5.2 Imunoensaio com peptídeos ligados à membrana

Para que seja possível analisar os 442 peptídeos anteriormente preditos, estes mesmos foram sintetizados em uma membrana de celulose através de um sintetizador automatizado. Nesta membrana foram testados 4 grupos de pool de soros (**Figura 5**), sendo eles: pool de indivíduos infectados de área endêmica (T0); pool de indivíduos 30 dias pós tratamento (30D); pool de possíveis reações cruzadas (RC) e pool de indivíduos não infectados de área não endêmica (CN).

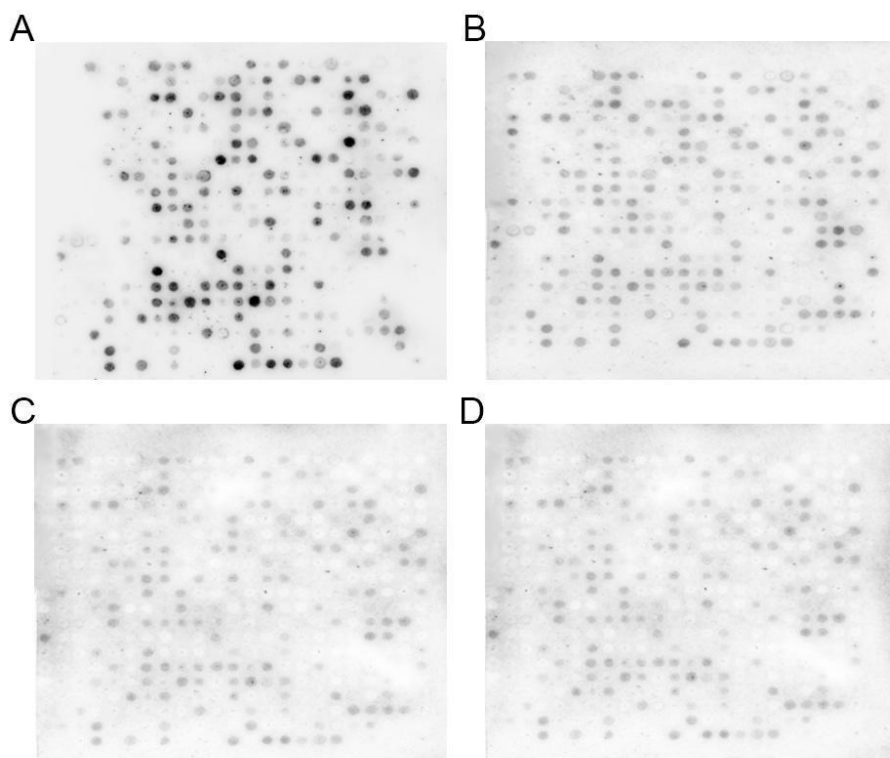


Figura 5: Revelações das membranas do imunoenensaio realizadas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 4.000, onde podem ser observados spots em tonalidades diferentes. Os spots claros correspondem aos peptídeos não reativos e os mais escuros correspondem aos peptídeos mais reativos, todos de acordo com o grupo de soros analisados. As membranas estão sinalizadas de A a D, onde a) é referente ao pool de soros de indivíduos infectados (T0); b) pool de soros de indivíduos 30 dias pós tratamento (30D); c) pool de soros de reação cruzada (RC) e d) pool do controle negativo (CN).

5.3. Densitometria

Através do Software ImageJ e a sua extensão ProteinArrayAnalyze (NIH), cada imagem da membrana obtida na revelação do immunoblotting foi analisada, gerando uma tabela para análises quantitativas e imagens com os padrões de reatividade de cada spot, através de escala colorimétrica (**Figura 6**).

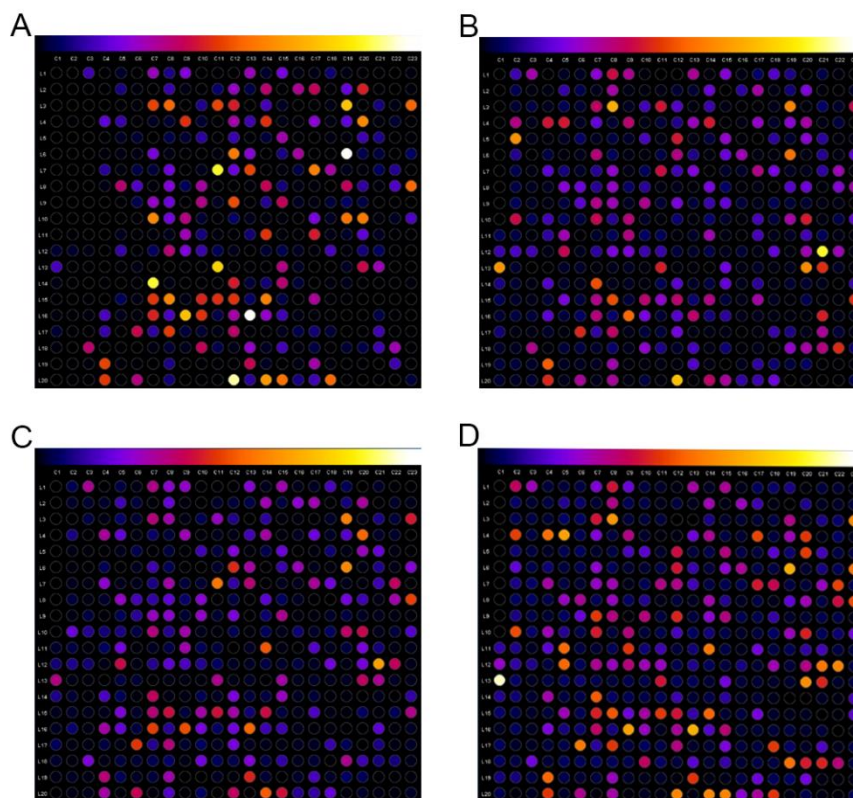


Figura 6: Análise densitométrica pós immunobloting. Todos os spots estão representados em escala colorimétrica, onde os extremos vão do preto ao branco. Sendo que, quanto mais próximo do preto menos reativo é aquele spot ou quando preto aquele spot não é reativo e quanto mais próximo do branco mais reatividade aquele spot apresenta, assim como demonstrado na escala na parte superior da imagem. a) soros de indivíduos infectados de área endêmica; b) soros 30 dias após realizado o tratamento; c) soros de possíveis reações cruzadas e d) controle negativo. Todas as imagens possuem o mesmo tempo de exposição de 30 segundos.

Além dos dados densitométricos através de escala de colorimetria, foi gerada também uma tabela com dados numéricos dos peptídeos selecionados.

A seguir nas **tabelas 3 a 5**, observa-se os dados densitométricos dos peptídeos. Cada linha se refere a um peptídeo diferente. A primeira coluna se refere à posição que o peptídeo se encontra na membrana; a segunda coluna aos seus respectivos pesos moleculares; as 4 colunas finais se referem aos valores densitométricos de cada grupo de soros, sendo, CN: controle negativo; RC: possíveis reações cruzadas; T0: indivíduos infectados e 30D: 30 dias pós tratamento. As sequências peptídicas não foram apresentadas por não possuírem ainda depósito de patentes.

Tabela 3: Peptídeos reativos para os soros do grupo T0

CN: Controle negativo; RC: Reação cruzada; T0: Infecção em patência e 30D: 30 dias pós tratamento.

Posição na Membrana	Peso Molecular	CN	RC	T0	30D
C14	1724,842157	23567,75	19593,25	27488	20817
J14	1745,871667	24285,75	19265,25	34329	21967
C18	1641,855348	1943,75	14996,25	27905	23765
M18	1839,012184	23672,75	18209,25	43817	24442
F19	1757,867643	23684,75	25592,25	32617	19179
I19	1580,816503	25177,75	12871,25	28320	12669
G20	1865,92516	8579,75	19762,25	27500	13196
O21	1673,812815	30222,75	22849,25	33339	18660
T22	1756,882289	33657,75	23380,25	31811	17296
G24	1792,882291	24075,75	17572,25	33091	18722
T25	1805,917948	26167,75	11194,25	30853	11503
J26	1454,719434	15417,75	20781,25	32036	16637
J27	1774,908112	24721,75	22230,25	32813	24173
C30	1564,734898	34249,75	24112,25	30480	22316
H30	1574,805939	28204,75	27334,25	30615	16530

Tabela 4: Peptídeos reativos para os soros do grupo 30D.

CN: Controle negativo; RC: Reação cruzada; T0: Infecção em patência e 30D: 30 dias pós tratamento.

Posição na Membrana	Peso Molecular	CN	RC	T0	30D
E09	1466,580416	4649,75	760,25	51	35332
M27	1775,73669	34925,75	21048,25	22412	34726

Tabela 5: Peptídeos reativos para os soros dos grupos T0 e 30D simultaneamente.

CN: Controle negativo; RC: Reação cruzada; T0: Infecção em patência e 30D: 30 dias pós tratamento.

Posição na Membrana	Peso Molecular	CN	RC	T0	30D
S11	1778,954669	30544,75	19797,25	27631	29582
N14	1840,981554	29652,75	21052,25	48547	28444
C15	1675,878768	35940,75	16495,25	30633	39269
O15	1629,760108	29158,75	23190,25	34203	28362
T19	1626,819299	33956,75	21088,25	51910	41362

Conforme a **Figura 7**, foi criado um diagrama de Venn com a quantidade de peptídeos reativos para os grupos de interesse. Sendo, 15 peptídeos reativos apenas para o grupo T0; 2 peptídeos apenas para o grupo 30D e 5 peptídeos que foram reativos para os dois grupos simultaneamente.

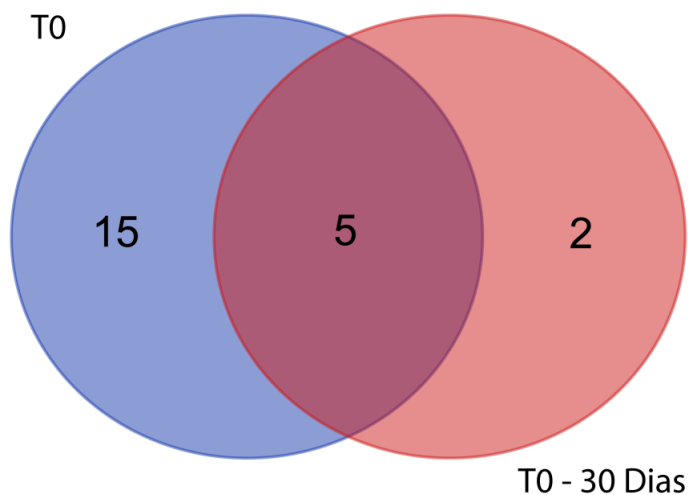


Figura 7: Diagrama de Venn os peptídeos reativos. Sendo a cor azul representando o grupo de infecção em patência (T0); Vermelho representando o grupo de 30 dias pós tratamento (30D) e a cor Vinho representando os peptídeos reativos para os dois grupos simultaneamente.

6. DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica possui grande impacto no sistema de saúde público e o sucesso dos métodos de controle adotados dependem da correta identificação dos indivíduos infectados, através do diagnóstico. O método padrão de diagnóstico utilizado e recomendado pela OMS é o exame parasitológico de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Exame que apresenta grandes limitações quanto à sua sensibilidade, o que acarreta em grande dificuldade para se obter maior controle da infecção no país. Com isso, estudos a fim de se aprimorar ou até de se produzir um novo método diagnóstico mais sensível têm sido realizados (UTZINGER et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2011). Como exemplo, existe disponível comercialmente um teste rápido (point-of-care circulating cathodic antigen - POC-CCA), um método de diagnóstico rápido de urina, que além de mostrar se o indivíduo está infectado ou não com o parasito, também possibilita a elucidação do seu nível de parasitemia (VAN DAM et al., 2004). Mas, ainda sim é um método que possui limitações no diagnóstico, necessitando de ajustes (VIANA et al., 2019). Alguns outros métodos como ELISA e PCR, apresentam ótima sensibilidade na detecção da presença do parasito no indivíduo, podendo ser ótimas opções de diagnóstico para a esquistossomose mansônica, mas necessitam de boa estrutura laboratorial, o que impossibilita seu uso em campo, além de necessitar de mão de obra qualificada para sua realização (WEERAKOON et al., 2015; DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004).

A fim de superar tais limitações no diagnóstico da infecção, este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar alvos imunogênicos para que seja possível produzir um teste rápido para o diagnóstico de *S. mansoni*, apresentando uma grande facilidade para ser usado em campo e em larga escala, por ser portátil e independente de mão de obra especializada para a sua utilização e uma alta sensibilidade, evitando resultados cruzados com infecção por outros parasitos. Como por exemplo as geo-helminoses, que são causadas por helmintos parasitos que em determinada fase necessitam passar pelo solo para dar continuidade ao seu ciclo de vida (JOURDAN et al., 2018). Estes helmintos, assim como *S. mansoni*, são comumente encontrados em países subdesenvolvidos que possuem debilitação em saneamento básico e distribuição de água, trazendo com isso grande limitação quanto à higiene básica da população atingida (HOTEZ et al., 2014). Quando em localidades que apresentam baixas ou moderadas endemicidades, seus sintomas podem ser inespecíficos ou até inexistentes, o que dificulta a identificação destes indivíduos infectados e conseqüentemente seus respectivos diagnósticos e tratamentos (ROBERTS, 2009; COOPER; BUNDY, 1988; KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2010; AKUTHOTA; WELLER, 2012).

Sendo assim, foi realizada uma etapa na predição e seleção dos peptídios através de biologia computacional com a finalidade de triar as sequências de *S. mansoni* através de um filtro, tendo a finalidade de remover qualquer sequência semelhante ao proteoma destes outros helmintos que pudessem gerar conflitos no diagnóstico devido a possíveis reações cruzadas. Uma vez que, por serem de grupos próximos e estarem presentes nas mesmas áreas, há possíveis chances de ocorrerem sobreposições entre os proteomas de geo-helmintos com os proteomas de *S. mansoni* (VLAMINCK et al., 2021; SILVA-MORAES et al., 2018)). Sendo elas: *Fasciola hepatica*, *Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Ascaris suum*, *A. lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis* e *Toxocara canis*. Após esta etapa de remoção foram selecionados então 422 peptídeos para a realização dos testes imunológicos.

Ao considerarmos que grande parte das áreas endêmicas do Brasil para *S. mansoni* são de baixa a moderada endemicidades, onde a maioria dos indivíduos infectados são considerados baixa carga parasitária (KATZ, 2018; SILVA-MORAES et al., 2019), e o atual método diagnóstico apresenta grande limitação em áreas que apresentam este cenário epidemiológico, o que gera um enorme comprometimento nas estratégias de controle da esquistossomose no país. É de extrema importância o desenvolvimento e utilização de um teste diagnóstico que apresente maiores níveis de sensibilidade (KATZ, 2018; OLIVEIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; SILVA-MORAES et al., 2018; SILVA-MORAES et al., 2019). O que nos leva a obter maiores curiosidades direcionadas ao desenvolvimento de novos métodos sorológicos. Porém, uma das discussões levantadas em relação ao diagnóstico sorológico, podendo ser considerada como uma importante limitação é de que a sorologia possui considerável desvantagem por não permitir a diferenciação de infecção passada para infecção ativa no indivíduo acometido. Tendo em vista que, as imunoglobulinas específicas do parasito podem ser mantidas em nível de pré-tratamento ou até aumentarem após a realização do tratamento. Assim como as respostas de citocinas podem ser alteradas, podendo até aumentar após o tratamento com praziquantel (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013; CALDAS et al., 2008). Tomando em conta tais observações, para este ensaio foi escolhido o anticorpo IgG, e esta escolha se deve aos fatos primeiramente de que a produção de IgG e suas subclasses é muito maior que a produção dos outros anticorpos, e até então não existem evidências experimentais da inibição de IgG reativo ao parasito por qualquer outra classe de imunoglobulina (RIHET et al., 1992). Além de que a resposta humoral (IgG, IgM e IgE) em indivíduos infectados frente aos antígenos do ovo ou do verme adulto do parasito não difere especificamente a fase aguda de fase crônica (CALDAS et

al., 2008). Ou seja, escolhemos primeiramente um anticorpo mais abundante, para depois aprofundarmos as análises utilizando outras classes de imunoglobulinas, especificando ainda mais os resultados.

Posto isto, ao realizarmos o ensaio de immunoblotting utilizando IgG como anticorpo secundário, foram selecionados peptídeos específicos para dois grupos de soros diferentes, sendo 15 peptídeos específicos para o grupo T0 e 2 peptídeos específicos para o grupo 30D. Abrindo então perspectivas para novos estudos com uma maior quantidade de amostras de soros e de forma individual. Podendo nos direcionar a possíveis resultados mais específicos sobre a reatividade de tais peptídeos, além de nos permitir análises de forma mais focada sobre indicadores de infecção ativa e indicadores de remissão, o que pode auxiliar futuramente no monitoramento e controle de cura dos indivíduos nas áreas endêmicas.

Apesar das possíveis limitações apresentadas pelo teste rápido, ele ainda traz consigo importantes vantagens no controle da esquistossomose mansônica. Primeiramente pode-se citar a otimização do tempo tanto da testagem, quanto da espera dos resultados. Além de que a presente função deste teste é de servir como um método de triagem para o teste parasitológico, onde apenas os indivíduos cujo resultado for positivo, irão realizar o teste de Kato-Katz. Com isso, o tratamento será direcionado corretamente apenas aos indivíduos realmente infectados, o que também irá diminuir as chances de resistência ao anti-helmíntico (WANG; WANG; LIANG, 2012; BOTROS; BENNETT, 2007).

Tomando em conjunto estes principais pontos citados, o teste auxiliará no aperfeiçoamento do controle da parasitose nas áreas endêmicas, diminuindo custos com tratamento, mão de obra e estrutura, além de agilizar todo o processo entre o diagnóstico e tratamento. trazendo consigo ainda uma maior sensibilidade, que contribuirá na detecção de indivíduos positivos que possivelmente resultariam como falso negativo no método atualmente utilizado. O que supostamente possibilitará a elucidação do real número de casos positivos e com isso propiciará um progresso no controle da infecção nas localidades endêmicas através do devido tratamento e monitoramento dos casos, favorecendo assim o direcionamento dos programas de controle da esquistossomose no Brasil. Futuramente será produzida uma proteína quimera contendo a sequência dos peptídeos selecionados para que seja desenvolvido o teste rápido que irá ser utilizado como método de triagem para o diagnóstico parasitológico em larga escala, para ser utilizado em campo.

Através deste trabalho podemos concluir que é praticável a utilização de peptídeos como base antigênica para o reconhecimento da infecção por *S. mansoni*. Resultando no possível

desenvolvimento de um novo método diagnóstico que apresente maior sensibilidade em relação ao atual utilizado e que possibilite um fácil manejo em campo e em larga escala. O que trará um maior alcance às populações das áreas endêmicas, e assim auxiliará no controle e possivelmente na eliminação da esquistossomose mansônica no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

ABRÀMOFFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ Part II. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–43, 2005.

AKUTHOTA, P.; WELLER, P. F. Eosinophilic pneumonias. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 649–660, 2012.

BARROS, A. M. DE L. A. B. E. DE A. B. E. DE O. L. S. DE C. **Re lação Na cional de Me dicamentos Essenciais Re lação Na cional de Me dicamentos Essenciais**. [s.l: s.n.].

BLANTON, R. E. et al. The Relative Contribution of Immigration or Local Increase for Persistence of Urban Schistosomiasis in Salvador, Bahia, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2015.

BOTROS, S. S.; BENNETT, J. L. Praziquantel resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. SUPPL. 1, 2007.

BOTTIEAU, E. et al. Imported Katayama fever: Clinical and biological features at presentation and during treatment. **Journal of Infection**, v. 52, n. 5, p. 339–345, 2006.

BRASIL, M. DA S. **MANSONI Diretrizes Técnicas Diretrizes técnicas**. [s.l: s.n.].

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 109–117, 2008.

CARVALHO, G. B. F. et al. Selecting targets for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection: An integrative approach using multi-omic and immunoinformatics data. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2017.

CARVALHO, O. D. S. et al. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de**

Saude do Brasil, v. 27, n. 3, p. e2017343, 2018.

CAWSTON, F. G. **The control of schistosomiasis** *Journal of the American Medical Association*, 1945.

CHAI, J. Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: An update. **Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 32–43, 2013.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917–940, 2002.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41–51, 2000.

CHUAH, C. et al. Schistosomiasis in Malaysia: A review. **Acta Tropica**, v. 190, p. 137–143, 2019.

COLES, G. C. Drug resistance or tolerance in schistosomes? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 294, 2002.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.

COOPER, E. S.; BUNDY, D. A. P. *Trichuris* is not trivial. **Parasitology Today**, v. 4, n. 11, p. 301–306, 1988.

DAWSON, E. M. et al. Intestinal schistosomiasis in pre school-aged children of Lake Albert, Uganda: Diagnostic accuracy of a rapid test for detection of anti-schistosome antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 10, p. 639–647, 2013.

DE OLIVEIRA, E. J. et al. Application of synthetic peptides in development of a serologic method for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. SUPPL. 1, p. 355–357, 2006.

DE OLIVEIRA, E. J. et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 360–366, 2008.

DE VLAS, S. J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitology Today**, v. 8, n. 8, p. 274–277, 1992.

DO AMARAL, R. S. et al. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. SUPPL. 1, p. 79–85, 2006.

DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: Can it be done with antibodies? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 35–39, 2004.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659–667, 2008.

ENGELS, D. et al. 1-s2.0-S0001706X02000451-main.pdf. v. 82, p. 139–146, 2002.

ESPIRITO-SANTO, M. C. C. et al. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. 2275–2284, 2014.

FALLON, P. G., & DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 51(1), 83–88, 1994.

FELDMEIER, H.; POGGENSEE, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. **Acta Tropica**, v. 52, n. 4, p. 205–220, 1993.

FERRARI, M. L. A. et al. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: A controlled trial. **Bulletin of the World Health**

Organization, v. 81, n. 3, p. 190–196, 2003.

FRANK, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**, v. 48, n. 42, p. 9217–9232, 1992.

GONÇALVES, M. M. L. et al. Fatores sócio-culturais e éticos relacionados com os processos de diagnóstico da esquistossomíase mansônica em área de baixa endemicidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 92–100, 2005.

GONÇALVES, M. M. L. et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Tropica**, v. 100, n. 1–2, p. 24–30, 2006.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

JOURDAN, P. M. et al. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252–265, 2018.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. [s.l.: s.n.].

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KHURROO, M. S.; KHURROO, M. S.; KHURROO, N. S. Trichuris dysentery syndrome: a common cause of chronic iron deficiency anemia in adults in an endemic area (with videos). **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 71, n. 1, p. 200–204, 2010.

KRAMER, A.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 87, p. 25–39, 1998.

KUDITHIPUDI, S. et al. Specificity analysis of protein lysine methyltransferases using

SPOT peptide arrays. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 93, p. e52203, 2014.

LAMBERTUCCI, J. R. **Acute schistosomiasis: Clinical, diagnostic and therapeutic features** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1993.

LUTZ, A. **Schistosomum Mansoni and Schistosomiasis observed in Brazil** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1919.

MCLAREN, M. L. et al. Serodiagnosis of human schistosoma mansoni infections: Enhanced sensitivity and specificity in elisa using a fraction containing s. mansoni egg antigens ω 1 and α 1. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 72–79, 1981.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2018.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do Strongyloidesstercoralis e da estrongiloidíase no Brasil. **Revista Serviços Específicos em Saúde Pública**, v. 1, p. 507- 624, 1948.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: Epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29–36, 2014.

OLIVEIRA, W. J. et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads : Saline gradient , Helmintex , Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006232, 2018.

RAMADA, J. S. et al. Synthetic peptides for invitro evaluation of the neutralizing potency of Loxosceles antivenoms. **Toxicon**, v. 73, n. July, p. 47–55, 2013.

RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

RIHET, P. et al. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 8, p. 2063–2070, 1992.

ROBERTS, A. D. Ascariasis. **Medical Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 14–20, 2009.

SILVA-MORAES, V. et al. Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infections in endemic area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–27, 2018.

SILVA-MORAES, V. et al. Diagnosis of schistosoma mansoni infections: What are the choices in brazilian low-endemic areas? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 2, 2019.

SINGH SAHARAN, G.; MEHTA, N.; MEENA, P. D. The Disease. **Alternaria Diseases of Crucifers: Biology, Ecology and Disease Management**, p. 17–51, 2016.

SIQUEIRA, L. M. V. et al. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 844–850, 2011.

TEFERA, A.; BELAY, T.; BAJIRO, M. Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection and associated risk factors among school children attending primary schools nearby rivers in Jimma town, an urban setting, Southwest Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–15, 2020.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding - Current status and outlook. **Journal of Immunological Methods**, v. 72, n. 2, p. 313–340, 1984.

UTZINGER, J. et al. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. **Parasitology**, v. 122, n. 5, p. 537–544, 2001.

VAN DAM, G. J. et al. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5458–5461, 2004.

VIANA, A. G. et al. Discrepancy between batches and impact on the sensitivity of point-of-care circulating cathodic antigen tests for *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Tropica**, v. 197, n. November 2018, p. 105049, 2019.

VLAMINCK, J. et al. Identification of antigenic linear peptides in the soil-transmitted helminth and *Schistosoma mansoni* proteome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 1–19, 2021.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871–1877, 2012.

WEERAKOON, K. G. A. D. et al. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 939–967, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION AFRICA. **Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis : progress report , 2020 Schistosomiase et géohelminthiasis : rapport de situation , 2020**, 2020. Disponível em: <www.whocc.it/a116.unina.it>

WHO2016, D. A. DJASTED L. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis : number of people treated in Schistosomiase et géohelminthiasis : nombre de personnes traitées en 2016. **Who**, n. November, p. 749–760, 2016.

WHO Expert Committee. “Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis.” **World Health Organization technical report series** vol. 912 (2002): i-vi, 1-57, 2002.

WINKLER, D. F. H.; CAMPBELL, W. D. The spot technique the spot technique: Synthesis and screening of peptide macroarrays on cellulose membranes. **Methods in Molecular Biology**, v. 494, p. 47–70, 2008.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimização de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil

Pesquisador: Ricardo Toshio Fujiwara

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63621316.4.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.978.864

8.2 Anexo 2:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Padrão da resposta imune nas infecções helmínticas: o papel da polarização da resposta imune na infecção por *Ascaris* spp.

Pesquisador: LILIAN LACERDA BUENO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 61101916.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.977.812

8.3 Anexo 3:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Manutenção de Helmintos Parasitos em Modelos Experimentais: Schistosoma mansoni; Strongyloides venezuelensis e Angiostrongylus costaricensis", protocolo do CEUA: 368/2018 sob a responsabilidade de Deborah Aparecida Negrao Correa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/12/2018.