

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Programa de Pós-graduação em Parasitologia - PPGP

Jordânia Costa Pinto

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO
DIAGNÓSTICO DE GEOHELMINTÍASES**

Belo Horizonte

2021

Jordânia Costa Pinto

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO
DIAGNÓSTICO DE GEOHELMINTÍASES**

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.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientador: João Luís Reis Cunha

Belo Horizonte

2021

043

Pinto, Jordânia Costa.

Seleção de peptídeos com potencial aplicação no diagnóstico de geohelmintíases [manuscrito] / Jordânia Costa Pinto. – 2021.

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

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara. Co-orientador: João Luís Reis Cunha.

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

1. Parasitologia. 2. Helmintíase. 3. Testes Imunológicos. 4. Biomarcadores. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Cunha, João Luís Reis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

418/2021/01

Jordânia Costa Pinto

entrada

1º/2019

2019654070

Às **quatorze horas** do dia **29 de março do ano de 2021**, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/qcc-uqkj-cgn>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “**Seleção de peptídeos com potencial aplicação no diagnóstico de geohelmintíases**” área de concentração: **Helmintologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG	Aprovada
Dr. Silvio Santana Dolabella	UFS	Aprovada
Dr. Stefan Michael Geiger	UFMG	Aprovada
Dr. João Luis Reis Cunha	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A)
CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Repassadas à candidata durante a arguição.

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): **Aprovada** _____

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 29 de março de 2021.

**Dr. Ricardo Toshio
Fujiwara**


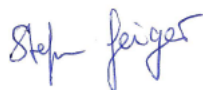


(Orientador)

Dr. Silvio Santana Dolabella



Dr. Stefan Michael Geiger



**Dr. João Luís Reis
Cunha**

(Coorientador)

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e minhas decisões.

Aos meus pais e irmãos por todo amor e confiança, por acreditarem no meu futuro.

Aos amigos da pós-graduação e do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) pela companhia e amizade. Ao meu amigo Jeferson por estar sempre presente.

Ao Kevin Wasller pelo carinho e incentivo.

Ao meu orientador, professor Ricardo Fujiwara por me receber como aluna, pela amizade e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Ao Dr. João Luís Reis Cunha pelo auxílio neste trabalho e por nunca medir esforços para me ajudar sempre que necessário.

Ao professor Fernando Sérgio Barbosa que me incentivou a seguir a carreira científica, obrigada pela amizade e pelo incentivo.

Aos professores do LIGP que não medem esforços para que possamos fazer pesquisa com qualidade.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia, em especial a coordenação, as queridas Sumara e Sibebe, pelo apoio e imenso carinho.

A todos os professores que foram fundamentais para a minha formação.

Às agências financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG por tornarem este projeto viável.

A Lilica que sempre me esperou com muita alegria em Arcos, e também por fazer tanta festa ao me ver chegar em casa. Obrigada pela companhia e pela fiel e verdadeira amizade!

A todos que me acompanharam até aqui e me apoiaram nessa caminhada, muito obrigada!

RESUMO

As geohelmintíases estão entre as doenças tropicais de maior prevalência no mundo, afetando aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas. Entre as espécies de importância epidemiológica, se destacam, *Ascaris lumbricoides*, *Trichiuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*. Esses helmintos são facilmente transmitidos através da ingestão de ovos ou exposição às larvas, que são liberados nas fezes de indivíduos infectados. As helmintíases causam grande impacto a saúde pública, afetando o aprendizado e desenvolvimento principalmente de crianças em fase escolar e pré-escolar. Nesse contexto, o controle dessas parasitoses se torna necessário e o diagnóstico preciso assume um papel fundamental nesse processo. O diagnóstico dos geohelmintos tem se baseado em técnicas parasitológicas, moleculares e imunológicas. Entretanto, os métodos disponíveis têm se mostrado falhos e de difícil aplicação em campo, sendo necessário o aprimoramento das técnicas atuais e a busca de novos métodos diagnósticos que sejam sensíveis, específicos e que não necessitem de aparelhagem especializada. No imunodiagnóstico são utilizados anticorpos específicos ou antígenos puros e fracionados do parasito para detecção de infecções. Nos últimos anos, o uso de extrato de antígenos de patógenos em ensaios de imunodiagnóstico tem sido substituído por peptídeos ou proteínas recombinantes com maior especificidade diagnóstica. O objetivo do presente trabalho foi selecionar alvos conservados para o diagnóstico sorológico de nematódeos, assim como alvos específicos para espécies epidemiologicamente relevantes na infecção humana. A partir de ferramentas *in silico* foi realizada a análise do proteoma predito, com base nos genes identificados em sequenciamentos de genoma dos nematódeos de interesse. Dessas análises foram identificados 1160 peptídeos que apresentaram alto *score* de predição de epítomos lineares de células B, entre estes, foram selecionados alvos específicos e conservados entre as espécies de interesse e ausentes em outros helmintos. Esses peptídeos foram submetidos a testes de reatividade por immunoblotting, com soros de indivíduos sabidamente positivos para as espécies de interesses, confirmados por técnicas parasitológicas, afim de filtrar os alvos mais promissores. No total foram selecionados 107 peptídeos alvos, sendo que 80 específicos (13 para ancilostomídeos, 41 para *Ascaris* sp., e 26 para *S. stercoralis*) e 27 conservados em mais de uma espécie. Os diversos alvos identificados apresentam grande potencial para o aprimoramento do diagnóstico das geohelmintíases.

Palavras-chave: Geohelmintíases; Imunodiagnóstico; Biomarcador.

ABSTRACT

Soil-transmitted helminths is among the most prevalent tropical diseases in the world, affecting approximately 1.5 billion people. Among the species of epidemiological importance, *Ascaris lumbricoides*, *Trichiuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Strongyloides stercoralis* stand out. These helminths are easily transmitted through ingestion of eggs or exposure to larvae, which are released into the feces of infected individuals. Helminthiasis has a major impact on public health, affecting the learning and development of children in school and pre-school age. In this context, the control of these parasites becomes necessary and the accurate diagnosis of these infections assumes a fundamental role in this process. The diagnosis of soil-transmitted helminths has been based on parasitological, molecular and immunological techniques. However, the available methods have proven to be flawed and difficult to apply in the field, requiring the improvement of current techniques and the search for new diagnostic methods that are sensitive, specific and that do not require specialized equipment. In the immunodiagnosis specific antibodies, pure or fractionated antigens of the parasite are used to detect infections. In recent years, the use of extract of pathogen antigens in immunodiagnostic assays has been replaced by peptides or recombinant proteins that have greater diagnostic specificity. The aim of the present study was to select conserved targets for the serological diagnosis of nematodes, as well as specific targets for epidemiologically relevant species in human infection. The predicted proteome was analyzed using *in silico* tools, based on the genes identified in the genome sequences of the nematodes of interest. From these analyzes, 1160 peptides were identified that showed a high score prediction for linear B cell epitopes, among which specific targets were selected and conserved among the species of interest and absent in other helminths. These peptides were subjected to reactivity tests by immunoblotting, with sera from individuals known to be positive for the species of interest, confirmed by parasitological techniques, in order to filter the most promising targets. In total, 107 target peptides were selected, 80 of which were specific (13 for hookworms, 41 for *Ascaris* sp., and 26 for *S. stercoralis*) and 27 conserved in more than one species. The various targets identified have great potential for improving the diagnosis of soil-transmitted helminths.

Keywords: Soil-transmitted helminths; Immunodiagnosis; Biomarker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência global dos geohelminthos; *Ascaris lumbricoides* (A), *Trichuris trichiura* (B), ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) (C) e *Strongyloides stercoralis* (D). Estudos sugerem a presença de *S. stercoralis* no Japão e Austrália, apesar de não estarem marcados no mapa como prevalentes (SCHÄR, et al. 2013). Adaptado de JOURDAN, et al. 2018.....16

Figura 2: Gráfico de Imunogenicidade de peptídeos. No gráfico gerado pelo *software* Immunorank com base em *score* de predição de epítomos lineares de células B e de desordem estrutural, demonstra em verde a região da proteína predita com alto grau de imunogenicidade e em amarelo o peptídeo escolhido, que seria a região mais imunogênica, portanto é a região de maior pico no gráfico demarcada pelo ponto em vermelho.....25

Figura 3: Delineamento experimental. Este fluxograma demonstra as principais etapas para obtenção dos antígenos alvos com potencial aplicação no diagnóstico de geohelmintíases.....30

Figura 4: Mapa de calor. Nesta figura, cada linha corresponde a um proteoma de helminto diferente, e cada coluna corresponde a um peptídeo diferente. O *score* de imunogenicidade é dado em uma escala de baixo score, azul, até alto score em vermelho. Dendrogramas em ambos os eixos X e Y agrupam as amostras por respectivamente similaridade de padrão entre isolados e entre peptídeos.....31

Figura 5: Imagens dos resultados do *Immunoblotting*. As imagens foram reveladas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 4.000, os spots claros correspondem aos peptídeos não reativos e os spots escuros indicam os reativos. a) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Ascaris*. b) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Trichuris trichiura*. c) M1 e M2 incubadas com pools de soro de ancilostomídeos. d) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Strongyloides venezuelensis* e) M1 e M2 incubadas com pools de soro negativos.....33

Figura 6: Análise densitométrica das membranas após *Immunoblotting*. Os spots estão representados em escala de cores que vai do preto ao branco, como demonstrado na barra acima da imagem, sendo que quanto mais próximo de branco mais reativo é aquele

spot, e os spots pretos não apresentam reatividade. a) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Ascaris*. b) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Trichuris trichiura*. c) M1 e M2 incubadas com pools de soro de ancilostomídeos. d) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Strongyloides venezuelensis*. e) M1 e M2 incubadas com pools de soro negativos.....35

Figura 7: Diagrama de Venn. Demonstração no número de peptídeos específico para cada espécie de geohelminto e também peptídeos que se demonstram conservados em mais de uma espécie.....39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Sequência de nematódeos de interesse nesse estudo e sequência de outros helmintos utilizados para comparação e exclusão de reação cruzada entre os organismos. Os códigos demonstrados abaixo, podem ser utilizados para a busca das sequências empregues neste trabalho. As amostras na coluna “Sequência de Nematódeos” correspondem as espécies de interesse para os testes diagnósticos, enquanto a coluna “Sequência de outros helmintos” contém as linhagens helmínticas que potencialmente podem causar reação cruzada com as espécies de interesse.....24

Tabela 1: Especificações das amostras de soros utilizadas nesse estudo.....27

Tabela 2: Dados de densitometria. A coluna “Posição” corresponde a posição dos peptídeos na membrana quanto ao sintetizador. Na coluna “Sequência” demonstra a sequência de aminoácidos que compõem o peptídeo. “Predição” se refere a espécie de nematódeo analisada em questão. A coluna “Peso molecular” demonstra o peso molecular dos peptídeos e a seguintes colunas os valores dos resultados de densitometria de cada soro; Controle Negativo (CN), ancilostomídeos, *Ascaris* sp., *S. stercoralis* e *T. trichiura*.....36

Tabela 3: Peptídeos específicos. Número de peptídeos reativos que se demonstraram bons alvos para diagnóstico específico.....37

Tabela 4: Resultados da densitometria para peptídeos específicos. As colunas “Peptídeo” corresponde a posição dos peptídeos na membrana quanto ao sintetizador. Na coluna “Sequência” demonstra a sequência de aminoácidos que compõem o peptídeo. A coluna “Peso Molecular” demonstra o peso molecular dos peptídeos e a seguintes colunas os valores dos resultados de densitometria de cada soro; (CN) Controle Negativo, e a espécie de interesse. A última coluna mostra a intensidade relativa (IR) que é dada pela razão entre o valor de densitometria do *spot* reativo para o pool de soros positivos (VDP), e o valor da leitura de densitometria do mesmo *spot* quando utilizado o pool de soros negativos (VDN). Através da fórmula: $IR=VDP/VDN$, que demonstra o quanto aquele *spot* seria mais reativo para o soro positivo que soro o negativo.....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CN: Controle Negativo

DIC: Diisopropilcarbodiimida

DMF: N, N-dimetilformamida

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

F-MOC: Fluorenylmethyloxycarbonyl

IR: Intensidade Relativa

KK: Kato-Katz

LAMP: Amplificação Isotérmica Mediada por Loop

LIGP: Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NMP: N-metil-pirrolidona

NR: Não redundante

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PBS: Tampão fosfato salina

TFA: Ácido trifluoroacético

TIPS: Tri-isopropilsilano

VDP: Valor de densitometria do *spot* positivo

VDN: Valor de densitometria do *spot* negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Geohelmintíases.....	15
1.2. Diagnósticos disponíveis para a infecção por geohelmintos.....	17
1.3. Aprimoramento do imunodiagnóstico para geohelmintos.....	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Identificação de peptídeos com alto <i>score</i> de predição de epítomos de células B	24
4.2. <i>Spot</i> síntese.....	26
4.3. Painel sorológico.....	26
4.4. <i>Immunoblotting</i>.....	27
4.5. Regeneração de membrana.....	28
4.6 Análise de densitometria	28
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
6. RESULTADOS	31
6.1 Identificação de peptídeos com alto <i>score</i> de predição de epítomos de células B	31
6.2 <i>Immunoblotting</i>.....	32

6.3 Densitometria	34
6.4 Seleção de peptídeos.....	36
7. DISCUSSÃO.....	41
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Geohelmintíases.....	16
1.2. Diagnósticos disponíveis para a infecção por geohelmintos.....	18
1.3. Aprimoramento do imunodiagnóstico para geohelmintos.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. METODOLOGIA	25
4.1. Identificação de peptídeos com alto <i>score</i> de predição de epítomos de células B	25
4.2. <i>Spot</i> síntese.....	27
4.3. Painel sorológico.....	27
4.4. <i>Immunoblotting</i>	28
4.5. Regeneração de membrana.....	29
4.6 Análise de densitometria	29
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Identificação de peptídeos com alto <i>score</i> de predição de epítomos de células B	32
6.2 <i>Immunoblotting</i>	33

6.3 Densitometria	35
6.4 Seleção de peptídeos	37
7. DISCUSSÃO	42
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Geohelmintíases

As infecções helmínticas são doenças tropicais negligenciadas consideradas um grande problema de saúde pública (WHO, 2021). Essas parasitoses atingem diversas regiões do globo, afetando principalmente países subdesenvolvidos onde são precárias as condições de saneamento básico e higiene, tais como América Latina, África Subsaariana, Ásia e Caribe (HOTEZ, et al. 2008). A presença da infecção pode estar associada a fatores do ambiente, como condições climáticas, e do hospedeiro, como idade, estado nutricional, além de fatores culturais, comportamentais e até profissionais (CHIEFFI & AMATO NETO, 2003). Embora sejam comuns em países de baixa renda, as infecções também atingem países desenvolvidos em populações vulneráveis (HOTEZ, et al. 2014). Estima-se que mais de 1,5 bilhões de indivíduos (24% da população mundial) estejam infectados por helmintos, sendo que em locais endêmicos a prevalência pode chegar a 60% (WHO, 2021).

Entre as doenças tropicais negligenciadas as geohelmintíases são que apresentam maior prevalência. Dentre os agentes etiológicos capazes de causar essas infecções, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, e *Strongyloides stercoralis* são as que mais se destacam (Figura 1) (HOTEZ, et al. 2008; OJHA, et al. 2014; TUYIZERE, et al. 2018; JOURDAN, et al. 2018; WHO, 2021). Esses parasitos são transmitidos através da ingestão de ovos ou exposição à larvas infectantes, que podem estar presentes no solo, água e alimentos contaminados por fezes de indivíduos parasitados. Essas formas são capazes de se desenvolver no hospedeiro, passando por diversas fases características em diferentes órgãos até atingirem o trato gastrointestinal (BETHONY et al. 2006). No intestino assumem a forma adulta, liberando ovos e larvas que são excretados nas fezes. Em locais de saneamento básico precário, essas formas infectantes liberadas nas fezes contaminam o ambiente, disseminando a infecção (BETHONY et al. 2006).

As geohelmintíases causam grande impacto na saúde humana, afetando de forma negativa no desenvolvimento e produtividade dos indivíduos infectados. Crianças em idade escolar e pré-escolar são as mais acometidas (WHO, 2011; PABALAN, et al. 2018). As alterações estão relacionadas à intensidade da carga parasitária, variando de morbidades leves a graves que incluem, anemia, desnutrição, dor abdominal crônica,

obstrução intestinal e comprometimento cognitivo, podendo chegar à perda da fisiologia de órgãos (WHO, 2011; OJHA, et al. 2014; PABALAN, et al. 2018).

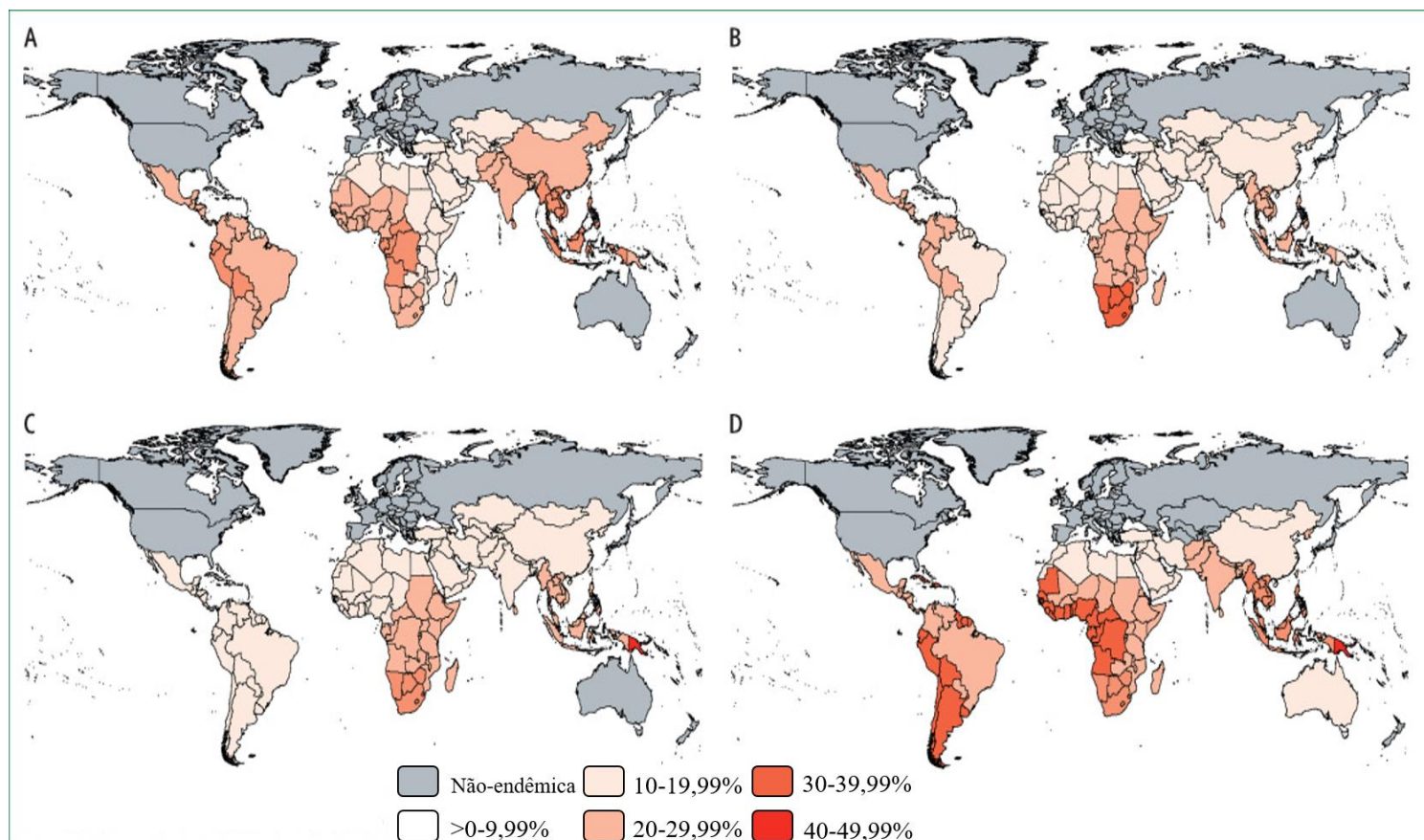


Figura 1: Prevalência global dos geohelmintos *Ascaris lumbricoides* (A), *Trichuris trichiura* (B), ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) (C) e *Strongyloides stercoralis* (D). Estudos sugerem a presença de *S. stercoralis* no Japão e Austrália, apesar de não estarem marcados no mapa como prevalentes (SCHÄR, et al. 2013). Adaptado de JOURDAN, et al. 2018.

Considerando o contexto de importância epidemiológica e os prejuízos ocasionados por essas infecções, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está empenhada no controle e eliminação dessas doenças (OPAS, 2018). Os esforços se concentram no diagnóstico sensível atrelado ao tratamento em massa de grupos de alto risco, através do uso de anti-helmínticos (CHU, et al. 2014; LO, et al. 2017; WHO, 2006, 2017, 2021). Verificar as estratégias de controle é crucial para avaliar o impacto na redução das infecções. Entretanto, os resultados desse tratamento ainda são pouco conhecidos devido à dificuldade de aplicação de metodologias diagnósticas disponíveis em campo, o que também reflete nos dados de endemicidade (CHU, et al. 2014;

SAVIOLI, et al. 2018; JOURDAN, et al. 2018). O diagnóstico é essencial para os programas de controle, servindo como indicador de endemicidade, além de informar sobre o possível progresso obtido na redução da prevalência, visto que nem sempre o tratamento é eficaz (KEISER, et al. 2008; MEDLEY, et al. 2016).

1.2. Diagnósticos disponíveis para a infecção por geohelmintos

O diagnóstico baseado em manifestações clínicas é impreciso, pois são frequentemente observados quadros variáveis, como indivíduos assintomáticos, e sintomáticos, com sintomas leves e/ou inespecíficos como náuseas, diarreia e dor abdominal, diferindo de acordo com a fase do ciclo de vida que o parasito se encontra e da intensidade do parasitismo (JOURDAN et al. 2018). Diante disso o diagnóstico laboratorial desempenha um importante papel na identificação objetiva da infecção. Diferentes metodologias são empregadas para o diagnóstico da infecção por geohelmintos, como os métodos parasitológicos convencionais, ensaios imunodiagnósticos e métodos moleculares. Entretanto, apesar da existência de inúmeras técnicas, quantitativas e qualitativas, todas têm sido objeto de críticas diversas (AZEVEDO, et al. 2017; COOLS, et al. 2019). Os diagnósticos parasitológicos atualmente utilizados, demandam tempo e mão de obra especializada, além de possuírem sensibilidade limitada em casos de baixas cargas parasitárias. Esses casos são comuns em áreas onde o tratamento em massa foi empregado, e à medida que os tratamentos são ampliados a prevalência declina, o que limita a detecção pela maioria das técnicas (NIKOLAY, et al. 2014; MEDLEY, et al. 2016; BECKER, et al. 2018; COOLS, et al. 2019).

Na rotina laboratorial o diagnóstico dessas parasitoses ocorre principalmente pelas técnicas parasitológicas convencionais, como sedimentação espontânea, microscopia direta, concentração em formol/acetato de etila, FLOTAC/Mini-FLOTAC, McMaster e Kato-Katz (KK), consideradas de baixo custo. Esses métodos dependem da visualização microscópica de ovos e/ou larvas liberados nas fezes e, portanto, demandam tempo e mão de obra especializada (MBONG et al. 2020). Devido à variação na contagem de ovos, causada pela excreção diária irregular ou distribuição não homogênea nas fezes, essas técnicas baseadas na microscopia podem ter diferentes sensibilidades, especialmente em locais de baixa endemicidade (BOOTH, et al. 2003; CRINGOLI, 2006; CARVALHO, et

al. 2012; NIKOLAY, 2014; AZEVEDO, et al. 2017; TURNER, et al. 2017; COOLS, et al. 2019).

Das técnicas parasitológicas, o KK é a mais amplamente utilizada para diagnóstico de geohelminhos no mundo (KATO, 1954; KATZ, et al. 1972). A OMS recomenda o KK para mapear, monitorar e avaliar programas de controle. Entretanto, esse teste tem demonstrado sensibilidade limitada em casos de baixa carga parasitária, subestimando os dados epidemiológicos dessas infecções (WHO, 2002). O método se baseia na clarificação dos ovos, a partir de uma solução diafanizadora. Estudos relatam que ovos de ancilostomídeos se clarificam rapidamente e se perdem quando não analisados logo após o preparo, dificultando sua visualização em microscópio. Além disso, o método de KK não é adequado para o diagnóstico larval, já que o uso da malha na tela de filtragem retem larvas que por isso dificilmente aparecem na lâmina preparada (GLINZ, et al. 2010; MACHICADO, et al. 2012). Embora estudos relatem que o aumento do número de lâminas analisadas possa melhorar o diagnóstico por KK, o mesmo se torna inadequado para análises em grande número de amostras, devido à demanda de tempo (KNOPP, et al. 2008).

Os diagnósticos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), são considerados ensaios de maior sensibilidade e especificidade, (GEORGE et al. 2016; RASHWAN, et al. 2017). Esses métodos permitem o diagnóstico da infecção, através da amplificação de regiões específicas do DNA do parasito (VERWEIJ, et al. 2007; BASUNI, et al. 2011; GEORGE, et al. 2016; RASHWAN, et al. 2017; PAPAIKOVOU, et al. 2019). No entanto, além do alto custo, representam um obstáculo para utilização em ambientes com recursos limitados, como laboratórios de pequeno porte e em áreas rurais e afastadas, pois além de necessitarem de mão de obra especializada, também requer uma estrutura com equipamentos específicos (COOLS, et al. 2019; MBONG et al. 2020). Outro ponto a se considerar é a falta de padronização para utilização dessas técnica no diagnóstico de infecções helmínticas em grandes estudos populacionais (COOLS, et al. 2019).

Os métodos de imunodiagnóstico baseados na detecção das reações antígeno/anticorpo como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) também vêm sendo estudados para o diagnóstico de geohelminhos (BIGGS, et al. 2009; HAWKINS, et al. 2016; VLAMINCK, et al. 2016). Em casos onde é utilizada a identificação de anticorpos no soro, é difícil diferenciar infecções atuais e passadas, pois podem

permanecer níveis de anticorpos circulantes mesmo após tratamento e cura. Por outro lado, a produção de anticorpos a partir de antígenos altamente reativos, se torna uma alternativa interessante, afim de utilizá-los como fonte de detecção de antígenos do parasito, o que comprovaria a presença deste, servindo como controle de cura da infecção. Nesse sentido, os testes sorológicos necessitam de antígenos mais reativos e sensíveis (NOORDIN, et al. 2005; MUTOMBO, et al. 2019). Estudos demonstram a ocorrência de reações cruzadas entre espécies do mesmo grupo, gerando a hipótese da identificação de um alvo múltiplo para diagnóstico, vista que as espécies se agrupam para os mesmos fins de controle, auxiliando na triagem de grandes números amostrais (NOORDIN, et al. 2005; MUTOMBO, et al. 2019). Como vantagem, metodologias de imunodiagnósticos podem ser otimizados para uso em campo, sem a necessidade de técnicos especializados, podem possuir baixo custo e não necessitar de aparelhagem complexa para sua execução.

As limitações dos diagnósticos disponíveis atualmente para geohelmintos são claras, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, que apresentem alta sensibilidade e especificidade, sejam de baixo custo, práticos e aplicáveis em campo. Essa necessidade assume caráter especial no monitoramento e planejamento dos programas de tratamento em massa, verificando a real prevalência das doenças e o impacto das intervenções (HAWKINS, et al. 2016; MEDLEY, et al. 2016; LIM, et al. 2018). Além disso, serão importantes para a otimização de laboratórios de análises clínicas com alta demanda, reduzindo tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento.

1.3. Aprimoramento do imunodiagnóstico para geohelmintos

Devido às dificuldades e limitações dos métodos diagnósticos disponíveis, se torna necessária a busca e identificação de novos biomarcadores com alto potencial antigênico que possam ser candidatos ao diagnóstico para geohelmintos. No imunodiagnóstico são utilizados anticorpos específicos, ou antígenos puros ou fracionados do parasito para detecção. Esse extrato de antígenos tem sido substituído por proteínas recombinantes que possam apresentar maior especificidade e sensibilidade, ao permitir a seleção de antígenos imunogênicos e específicos do patógeno de interesse (ZAHABIUN, et al. 2015). Os avanços tecnológicos em torno do diagnóstico têm se direcionado para os imunoenaios. As ferramentas *in silico* são importantes no processo de busca de peptídeos imunogênicos reduzindo o tempo que seria gasto em experimentos laboratoriais. Com o uso dessas ferramentas é possível processar e analisar um grande volume de dados do

proteoma das espécies de interesse, facilitando a predição de biomarcadores mais refinados (SUN, et al. 2019).

A identificação e caracterização de peptídeos com alto *score* de predição de epítomos de células B são importantes e podem ser utilizados para otimização das técnicas de diagnóstico atuais e desenvolvimento de novos testes que podem servir como diagnóstico de triagem ou confirmatório da doença (EBRAHIMI, et al. 2019). Os peptídeos selecionados por bioinformática podem ser sintetizados em larga escala para averiguar sua reatividade, facilitando a padronização e utilização em testes futuros. Além disso, as regiões preditas com alto grau de imunogenicidade podem ser combinadas, servindo de estrutura para o design de uma proteína quimera, com múltiplos epítomos originados de diferentes proteínas, o que poderia aprimorar ainda mais o diagnóstico, aumentando sua acurácia quando comparado ao extrato bruto (JIANG, et al. 2013; EBRAHIMI, et al. 2019).

Antígenos recombinantes já foram testados para aplicação no diagnóstico de doenças parasitárias humanas e veterinárias, e têm apresentado resultados promissores. Em infecções por *Toxocara* sp., Dos Santos, et al. (2019) obtiveram sensibilidade de 97,22% e especificidade de 90,00%, no diagnóstico em ovelhas, bovinos e equinos utilizando proteínas recombinantes de *T. canis*. Virginio, et al. em 2003 testaram antígenos recombinantes para diagnóstico de *Echinococcus granulosus* e obtiveram especificidade de 99,50% e sensibilidade de 93,10% para diagnósticos da Hidatidose humana.

Portanto, os antígenos recombinantes surgem como uma alternativa de aprimoramento dos métodos diagnósticos atuais para diversas infecções. Diante disso, este projeto propõe a busca de novos antígenos a serem utilizados no diagnóstico dos geohelmintos *Ascaris* sp., *Trichiuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*.

2. JUSTIFICATIVA

Os geohelmintos afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo, causando desnutrição, atraso no crescimento, retardo intelectual, déficit cognitivo e educacional (PABALAN, et al. 2018). Devido ao impacto em saúde pública, a OMS tem inserido essas parasitoses em programas especiais para controle e eliminação de doenças (WHO, 2006, 2017, 2021). Uma das estratégias de controle é o tratamento em massa, que vem sendo aplicado em diversas regiões endêmicas (WHO, 2017). Entretanto, os resultados dessa ação ainda são pouco conhecidos, devido à dificuldade de aplicação das metodologias diagnósticas em campo, e podem levar ao desenvolvimento de resistência nos patógenos as drogas utilizadas (CHU, et al. 2014; TURNER, et al. 2017; SAVIOLI, 2018).

Os diagnósticos parasitológicos convencionais para geohelmintos, demandam tempo e mão de obra especializada, além de possuírem sensibilidade limitada em casos de baixas cargas parasitárias (NIKOLAY, et al. 2014; MEDLEY, et al. 2016; TURNER, et al. 2017; COOLS, et al. 2019). Já, os métodos moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, entretanto além do alto custo, são de difícil aplicação em campo, principalmente diante da realidade epidemiológica onde grande parte dos afetados vivem em locais de extrema pobreza (COOLS, et al. 2019). As técnicas de imunodiagnóstico também podem ser utilizadas, mas necessitam de antígenos mais reativos e sensíveis.

Portando, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, que sejam de baixo custo, práticos e aplicáveis em campo, são essenciais no monitoramento e planejamento dos programas de tratamento em massa, especialmente para verificar a eficiência dos medicamentos utilizados, visto que apesar de cada espécie possuir suas características, elas são agrupadas para os mesmos fins de controle devido à similaridade de endemicidade geográfica, dos grupos de risco afetados e do tratamento no qual ser utilizados os mesmos medicamentos, além da similaridade do impacto negativo a saúde humana (MEDLEY, et al. 2016; LIM, et al. 2018; OPAS, 2018). Além disso, são importantes para otimização do trabalho em laboratórios de análises clínicas com alta demanda, reduzindo tempo entre o diagnóstico e início do tratamento.

Nesse contexto, as ferramentas *in silico* para predição de alvos antigênicos no proteoma de helmintos facilitam essa busca, por permitir a rápida avaliação de grande número de alvos. Diante do apresentado, das limitações das técnicas atualmente empregadas, e da expansão dos programas de controle na era da quimioterapia preventiva,

justifica-se a importância desse estudo que buscou selecionar novos biomarcadores de alta imunogenicidade, contribuindo para o aprimoramento do diagnóstico dos geohelmintos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar novos biomarcadores para serem utilizados no imunodiagnóstico simultâneo e específico de infecções por geohelminintos.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar peptídeos com alto *score* de predição de epítomos reconhecidos por célula B no proteoma predito de geohelminintos;

2. Selecionar os peptídeos conservados e específicos entre as espécies de nematódeos;

3. Validar a reatividade *in vitro* dos peptídeos e selecionar os alvos mais reativos.

4. METODOLOGIA

4.1. Identificação de peptídeos com alto *score* de predição de epítomos de células B

Para a seleção dos peptídeos conservados entre nematódeos foi realizada uma busca dos proteomas preditos de espécies de nematódeos nos bancos de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) e WormBase (Quadro 1). Foram também obtidas sequências de outros helmintos, para a exclusão de peptídeos com possível reação cruzada com estes organismos

Quadro 1: Sequência de nematódeos de interesse e de outros helmintos utilizados para comparação e exclusão de reação cruzada entre os organismos. Os códigos demonstrados abaixo, podem ser utilizados para a busca das sequências empregadas neste trabalho. As amostras na coluna “Sequência de Nematódeos” correspondem às espécies de interesse para os testes diagnósticos, enquanto a coluna “Sequência de outros helmintos” contém as linhagens helmínticas que potencialmente podem causar reação cruzada com as espécies de interesse.

Sequência de Nematódeos	Sequência de outros helmintos
ancylostoma_duodenale.PRJNA72581	taenia_asiatica.PRJEB532.WBPS14
ascaris_lumbricoides.PRJEB4950	taenia_saginata.PRJNA71493.
ascaris_suum.PRJNA62057	taenia_solium.PRJNA170813
enterobius_vermicularis.PRJEB503	hymenolepis_diminuta.PRJEB507
necator_americanus.PRJNA72135	hymenolepis_nana.PRJEB508
strongyloides_stercoralis.PRJEB528	fasciola_hepatica.PRJEB25283
trichuris_trichiura.PRJEB535	fasciola_hepatica.PRJNA179522
toxocara_canis.PRJEB533	schistosoma_mansonii.PRJEA36577

Para se obter um conjunto de dados de qualidade, as sequências de proteínas preditas presentes nos proteomas baixados foram filtradas por ferramentas de bioinformática desenvolvidas no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) da UFMG, utilizando três parâmetros: 1-Apresentar mais de 100 aminoácidos; 2-Não apresentar stop códon interno (não ser pseudogene) e 3-Apresentar o stop códon na última posição da sequência, para garantir que a anotação não foi interrompida antes do fim da sequência. Estes proteomas preditos filtrados foram submetidos ao *software* Immunorank (dados não publicados) desenvolvido por pesquisadores do LIGP. Este

programa permite a seleção de peptídeos com base em *score* de predição de epítomos lineares de células B e de desordem estrutural. O programa foi utilizado no modo “peptídeo”, que permite selecionar peptídeos com maior *score* de ranqueamento de imunogenicidade (Figura 2). Inicialmente, foram selecionados 5000 peptídeos de 15 aminoácidos a partir do proteoma predito de cada um dos nematódeos, de onde foram feitas a avaliação de conservação destes peptídeos entre todas as espécies de nematódeos.

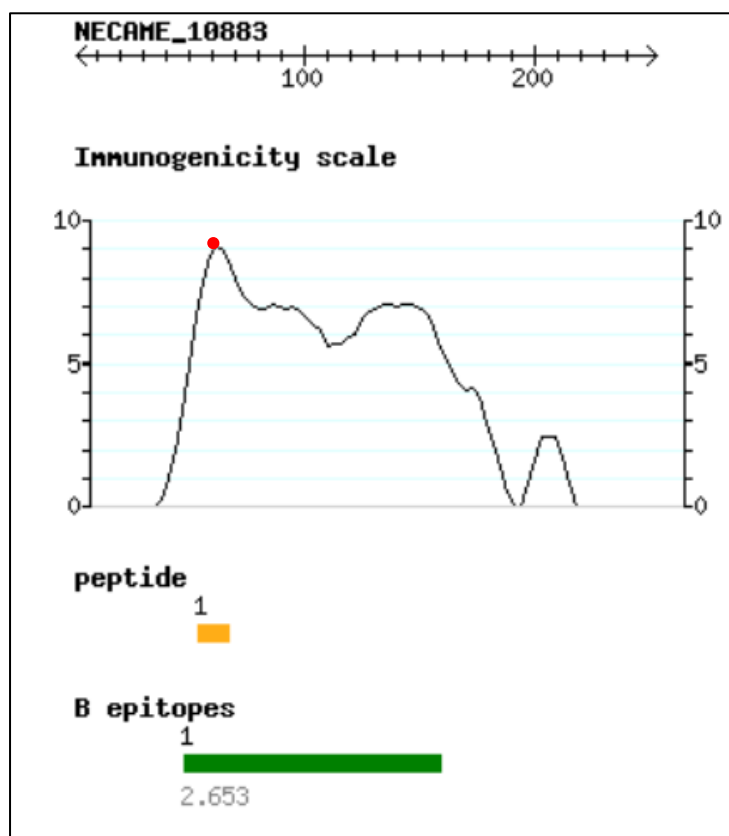


Figura 2: Gráfico de Imunogenicidade de peptídeos. No gráfico gerado pelo *software* Immunorank com base no *score* de predição de epítomos lineares de células B e de desordem estrutural, observa-se em verde a região da proteína predita com alto grau de imunogenicidade e em amarelo o peptídeo escolhido, que seria a região mais imunogênica, portanto é a região de maior pico no gráfico demarcada pelo ponto em vermelho.

A seguir, os peptídeos conservados foram utilizados como query em uma análise de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) no NCBI contra todo o proteoma predito de outros helmintos, onde foram excluídas as sequências que apresentaram identidade e cobertura da query maior que 70 % com outros helmintos, reduzindo a

chance de ocorrência de reação cruzada. Finalmente, os peptídeos selecionados foram submetidos a um BLASTp contra o proteoma humano depositado no banco de dados NR (não redundante) do NCBI, afim de verificar se suas sequências não são encontradas no hospedeiro. Foram selecionados os peptídeos que passaram nestes filtros para serem sintetizados utilizando a técnica de *Spot* síntese.

4.2. *Spot* síntese

Os peptídeos selecionados *in silico* com maior *score* de predição de epítomos de célula B, foram sintetizados de forma focal diretamente em uma membrana de celulose para triagem da reatividade (FRANK, 1992). Esse método permite a construção rápida de um grande número de peptídeos depositados em pontos (*Spot*), delimitados por um volume mínimo (HILPERT, et al. 2007). A membrana possui grupos carboxila livres que podem ser derivatizados para inserção de um grupo que possibilitará a ancoragem do peptídeo (FRANK, 1992; KUDITHIPUDI, et al. 2014). A síntese foi realizada no equipamento ResPep RS (Intavisp) no LIGP. Inicialmente, os resíduos de aminoácidos 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (F-MOC) foram ativados com a adição de diisopropilcarboidimida (DIC) e Oxyma em meio de N-metil-pirrolidona (NMP) e anidrido acético 3%. Após a inserção do F-MOC e compostos à sua respectiva posição na membrana a mesma foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas e aguardada a reação. Foi então realizada a etapa de desproteção onde o F-MOC foi removido da extremidade N-terminal com a solução de piperidina a 20% (LAUNE, et al. 2002). Um novo ciclo de dispensação de aminoácidos foi então realizado. Essas etapas se repetiram até que o último aminoácido fosse incorporado ao peptídeo que está sendo sintetizado. Ao final da síntese a desproteção das cadeias laterais foi realizada através do tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) seguida da adição do reagente *scavenger* (“limpador”) tri-isopropilsilano (TIPS) para evitar o ataque dos resíduos aos peptídeos sintetizados. Foram geradas duas membranas a primeira contendo 600 e a segunda 560 peptídeos selecionados anteriormente nos ensaios, dando um total de 1160 peptídeos.

4.3. Painel sorológico

Foram utilizadas neste estudo soros humanos não infectados (controles) e soros humanos e animais infectados pelo nematódeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides venezuelensis*, sendo essa última espécie o modelo experimental utilizado para estudo da biologia e

infecção por *Strongyloides stercoralis*. (Tabela 2). As amostras de soro humano positivas fazem parte do banco de soros do LIGP, ICB/UFMG. O critério de inclusão das amostras de soro foi a positividade demonstrada pelas técnicas parasitológicas de Sedimentação espontânea (LUTZ, 1919), Kato-Katz (KATZ,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. 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).

Tabela 2: Especificações das amostras de soros utilizadas nesse estudo.

Nematódeo	Espécie de amostra	Nº de amostras
<i>Ascaris</i> sp.	Humano	10
<i>Trichuris trichiura</i>	Humano	10
Ancilostomídeos	Humano	10
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	Camundongo	10

4.4. Immunoblotting

As membranas de peptídeos produzida por *Spot*-síntese foram submetidas a immunoblotting para verificar a sensibilidade e especificidade com amostras de soro sabidamente positivas para nematódeos de interesse, e também controles negativos (TOWBIN & GORDON, 1984). A membrana foi bloqueada com solução de PBS pH 7,2-7,4 contendo 5% de BSA e 4% de sacarose durante 12-16 horas em agitação. Em seguida a mesma foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem (PBS pH 7,2-7,4+ 0,1% de Tween 20) por 10 minutos e incubada por duas horas com os soros diluídos (humanos infectados 1:1000 ou animais infectados 1:500) na solução de lavagem. Após a incubação foram realizadas mais três lavagens de 10 minutos seguida por incubação por uma hora com o anticorpo secundário (anti-IgG humano na diluição de 1:10000 quando utilizado soro humano ou anti-IgG mouse na diluição de 1:1000 quando utilizado soro de camundongo) (Sigma-Aldrich) conjugado a peroxidase. A membrana foi novamente lavada três vezes com a solução de lavagem e finalmente revelada por quimioluminescência, através da

adição do substrato Luminata (Immobilon Forte Western HRP substrate), utilizando o fotodocumentador ImageQuant LAS 4.000, com exposição por 20 minutos. Como controles negativos, soros humanos não infectados passaram pelos mesmos processos previamente descritos.

4.5. Regeneração de membrana

A membrana contendo os peptídeos após ser utilizada para o *Immunoblotting* foi submetida a um tratamento de regeneração para reutilização posterior, neste processo são removidos todos os anticorpos ligados a ela. Primeiramente foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada, com dimetilformamida (DMF). Após lavagem, a membrana foi incubada por 12 a 16 horas em solução desnaturante contendo, Uréia a 8M, SDS a 1% e 0.1% de 2-mercaptoetanol para remoção dos complexos moleculares ligados aos peptídeos. Posteriormente foi submetida a outras três lavagens de 10 minutos cada, com uma solução contendo 50% de etanol, ácido acético a 10% e 40% de água deionizada. A membrana após lavagens foi seca em temperatura ambiente e mantida a 4°C para conservação dos peptídeos, permitindo sua reutilização para outros soros de interesse (RAMADA, et al. 2013).

4.6 Análise de densitometria

As duas membranas (M1 com 600 peptídeos e M2 com 560 peptídeos) ao passarem pelo teste de reatividade pelo *immunoblotting* foram submetidas a análise de densitometria pelo *Software* Imagej e a extensão Protein Array Analyzer. O programa gera tabelas com os valores de reatividade que são utilizadas para as análises estatísticas, e uma figura qualitativa com o padrão de reatividade dos *spots* de cada membrana.

Como o N amostral utilizado foi suficientemente grande ($n = 1160$), pelo Teorema Central do Limite é possível afirmar que a distribuição amostral das médias pode ser considerada uma distribuição normal, o que nos permitiu fazer inferências estatísticas utilizando propriedades inerentes de uma distribuição gaussiana. Sendo assim, foram utilizados os intervalos ao redor da média do controle negativo para calcular o cut-off, acrescido dos desvios padrões, para definir se um peptídeo seria considerado reativo.

Dados estatísticos:

- Média do controle negativo: **1849.39**
- Desvio padrão sobre o controle negativo: **3286.50**

- 1º cut-off (média CN + 2 desvios padrão) para exclusão de peptídeos reativos no controle negativo: **8422.35**
- 2º cut-off (média CN + 3 desvios padrão) para determinação de peptídeos reativos no soro positivo: **11708.86**

O intervalo determinado por dois desvios padrão (-2σ , $+2\sigma$) é o primeiro estatisticamente relevante e engloba 95,45% dos valores da população. Já o intervalo determinado por três desvios padrão (-3σ , $+3\sigma$) engloba 99,73% do conjunto (CORREIA, 2003). Para o cut-off de exclusão de peptídeos reativos no controle negativo ou nos soros utilizamos a média do controle negativo + 2σ . Já para o cut-off de seleção de peptídeos reativos do soro positivo utilizamos a média do controle negativo + 3σ .

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software R (CORE TEAM), sendo calculados os coeficientes estatísticos com os valores do controle negativo e, a partir deles, a seleção de peptídeos reativos.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

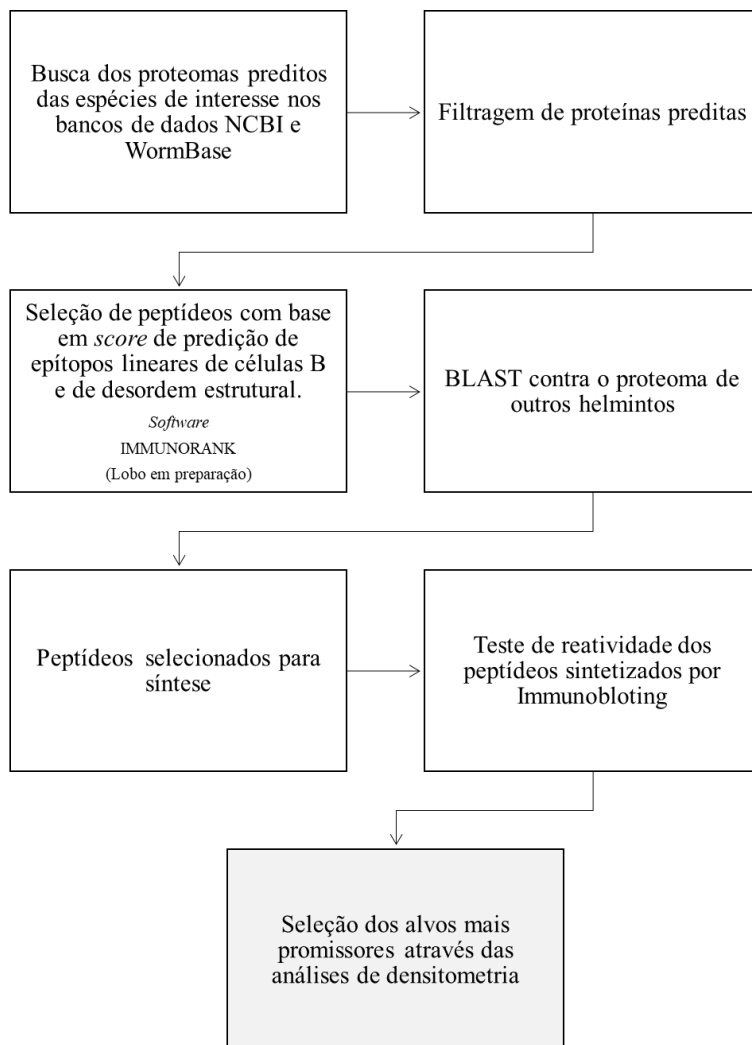


Figura 3: Delineamento experimental. Este fluxograma demonstra as principais etapas para obtenção dos antígenos alvos com potencial aplicação no diagnóstico de geohelmintíases.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação de peptídeos com alto *score* de predição de epítomos de células B

Para identificação dos peptídeos de interesse, os proteomas obtidos nos bancos de dados NCBI e WormBase foram filtrados levando em consideração parâmetros que evitassem possíveis erros de anotação das sequências. Após filtragem, as sequências foram submetidas ao *Software* Immunorank que identificou 5000 peptídeos de cada espécie com o tamanho de 15 aminoácidos, gerando um total de 80000 sequências. Para termos uma melhor visualização do grande volume de dados, geramos um mapa de calor que vai de tons de azul ao vermelho, onde quanto mais vermelho maior o *score* combinado de epítomos de célula B e desordem estrutural do peptídeo (Figura 4).

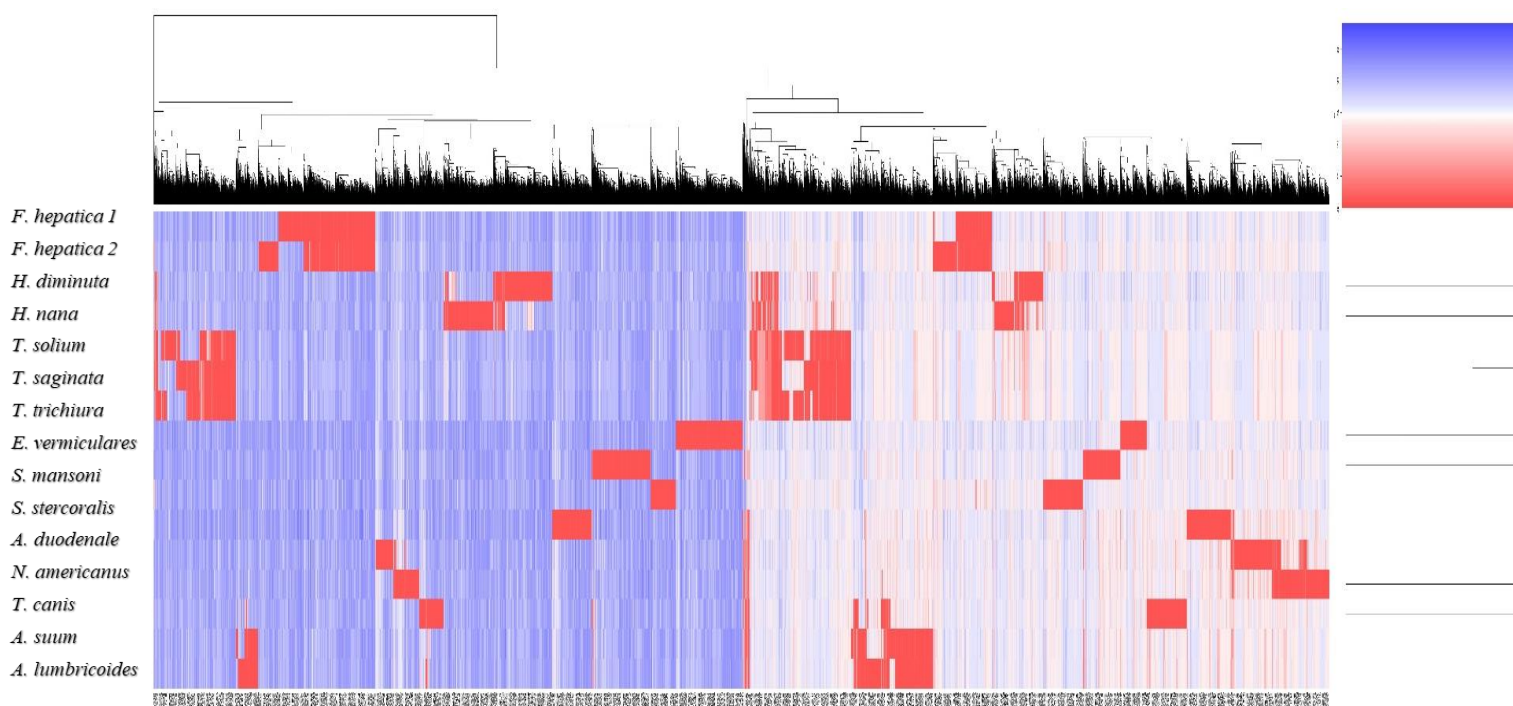


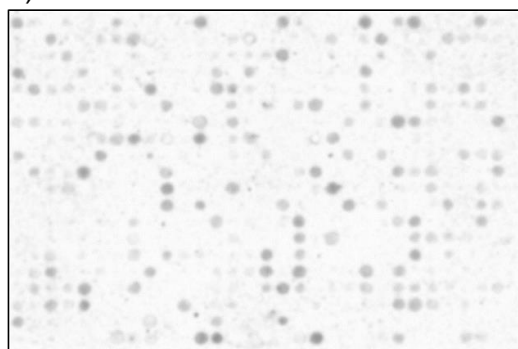
Figura 4: Mapa de calor. Nesta figura, cada linha corresponde a um proteoma de helminto diferente, e cada coluna corresponde a um peptídeo diferente. O *score* de imunogenicidade é dado em uma escala de baixo *score*, azul, até alto *score* em vermelho. Dendrogramas em ambos os eixos X e Y agrupam as amostras por similaridade de padrão entre isolados e entre peptídeos, respectivamente.

Fazendo uma análise visual podemos observar que existem peptídeos potencialmente específicos, que discriminariam as espécies, estes apresentam cor vermelha em um determinado isolado e azul em todos os outros, e também peptídeos conservados que se encontram em vermelho em duas ou mais espécies, e que podem auxiliar em um pan diagnóstico servindo como método de triagem em grandes estudos populacionais e em grandes centros laboratoriais.

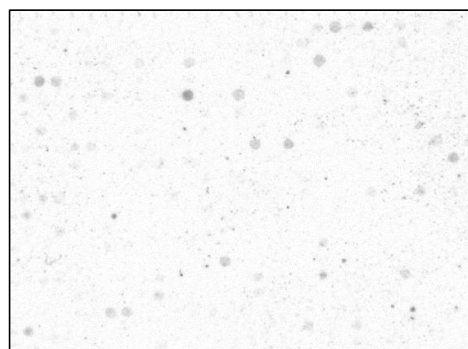
6.2 Immunoblotting

Afim de validar os resultados obtidos nas predições *in silico*, os peptídeos selecionados foram sintetizados em duas membranas, sendo a primeira (M1) com 600 sequencias (posições A01 – T30) e, a segunda (M2), com 560 peptídeos (posições A31 – T58), todos apresentando o maior *score* de predição de epítipo de célula B pelo Immunorank. Estas membranas foram incubadas com 4 pools distintos de soros humanos e de camundongos infectados com os helmintos *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, ancilostomídeos e *S. stercoralis*. Como controle negativo, as membranas foram incubadas com pool de soros de 10 humanos não infectados. Os resultados obtidos neste experimento podem ser observados na Figura 5. Ambas as imagens apresentadas foram retiradas no intervalo de tempo de 60 segundos para fins de comparação.

a)

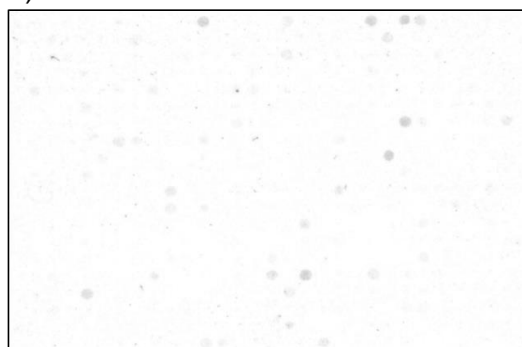


M1 Pool *Ascaris* sp.

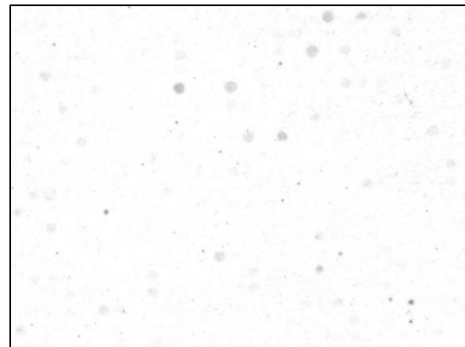


M2 Pool *Ascaris* sp.

b)



M1 Pool *Trichuris trichiura*



M2 Pool *Trichuris trichiura*

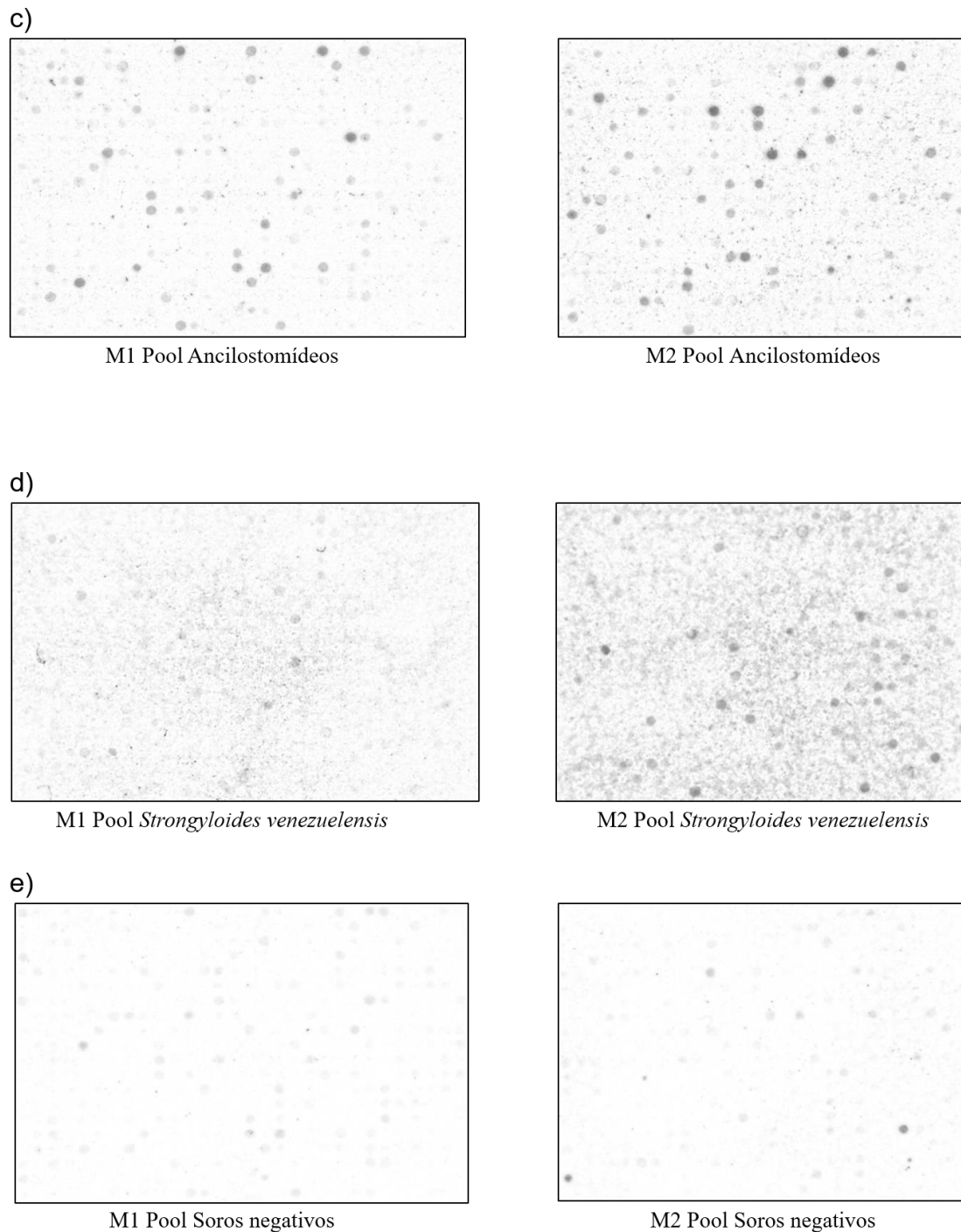
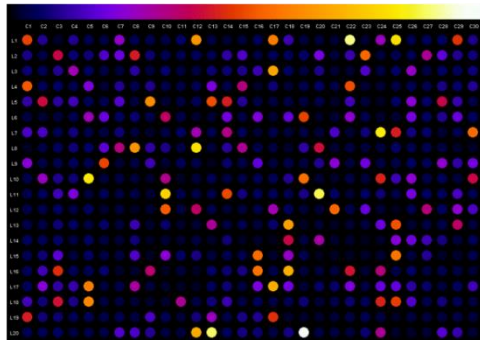


Figura 5: Imagens dos resultados do *Immunoblotting*. As imagens foram reveladas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 4.000, os spots claros correspondem aos peptídeos não reativos e os spots escuros indicam os reativos. a) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Ascaris* sp. b) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Trichuris trichiura*. c) M1 e M2 incubadas com pools de soro de ancilostomídeos. d) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Strongyloides venezuelensis*. e) M1 e M2 incubadas com pools de soro negativos.

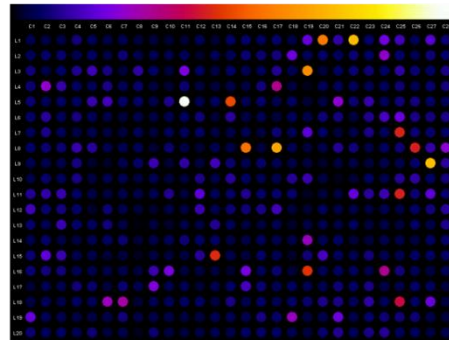
6.3 Densitometria

As imagens obtidas através dos ensaios de *Immunoblotting* foram submetidas às análises densitométricas utilizando o software ImageJ e a extensão Protein Array Analyzer (NIH). O programa gera tabelas com valores de reatividade (exemplo na Tabela 3), que são utilizadas para as análises quantitativas, e uma figura qualitativa com os padrões de reatividade dos spots de cada membrana, conforme demonstrado na Figura 6.

a)

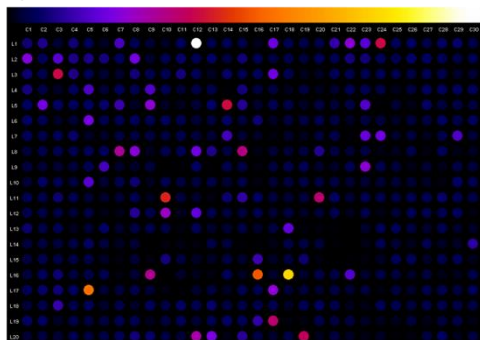


M1 Pool *Ascaris* sp.

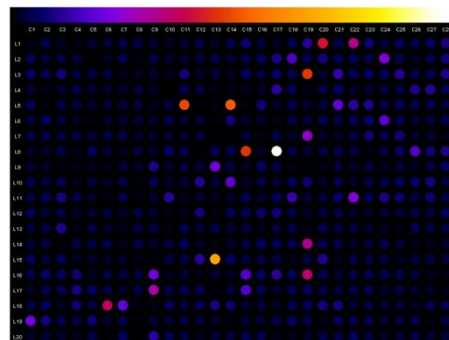


M2 Pool *Ascaris* sp.

b)

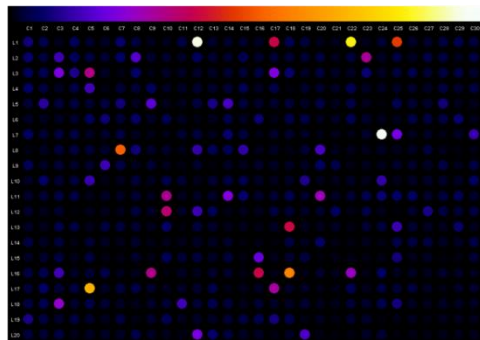


M1 Pool *Trichuris trichiura*

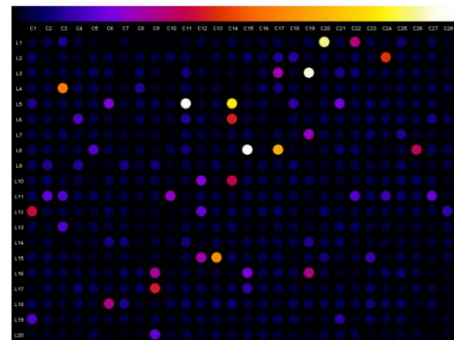


M2 Pool *Trichuris trichiura*

c)



M1 Pool Ancilostomídeos



M2 Pool Ancilostomídeos

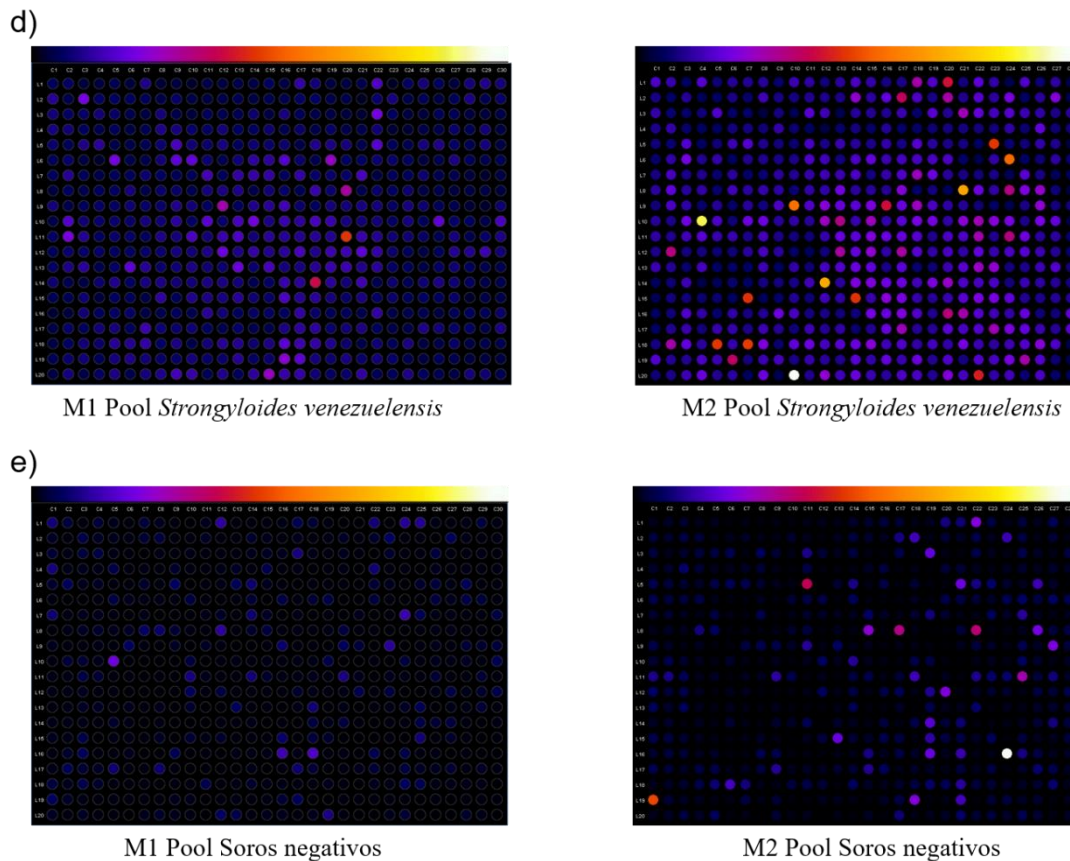


Figura 6: Análise densitométrica das membranas após *Immunoblotting*. Os spots estão representados em escala de cores que vai do preto ao branco, como demonstrado na barra acima da imagem, sendo que quanto mais próximo de branco mais reativo é aquele spot, e os spots pretos não apresentam reatividade. a) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Ascaris*. b) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Trichuris trichiura*. c) M1 e M2 incubadas com pools de soro de ancilostomídeos. d) M1 e M2 incubadas com pools de soro de *Strongyloides venezuelensis*. e) M1 e M2 incubadas com pools de soro negativos.

Os valores de reatividade gerados pela densitometria foram analisados em uma tabela formatada de forma adequada, onde cada linha corresponde a um peptídeo e cada coluna corresponde aos valores de reatividade para determinado soro. Foram adicionados ainda informações de interesse, como a posição do peptídeo na membrana, sequência peptídica, peso molecular e a predição de bioinformática associada, as sequências peptídicas não estão demonstradas pois as patentes ainda não foram depositadas (Tabela 3). Por fim, foi retirado a reatividade de fundo (background) de cada membrana, a fim de torná-las comparáveis. Para isso, a partir do valor médio dos quatro menores valores de cada membrana, foi realizada a subtração do valor obtido daquele apresentado por todos

os spots presentes na membrana. Resultados menores que zero foram substituídos pelo valor de 1.

Tabela 2: Dados de densitometria. A coluna “Posição” corresponde a posição dos peptídeos na membrana quanto ao sintetizador. Na coluna “Sequência” demonstra a sequência de aminoácidos que compõem o peptídeo. “Predição” se refere a espécie de nematódeo analisada em questão. A coluna “Peso molecular” demonstra o peso molecular dos peptídeos e a seguintes colunas os valores dos resultados de densitometria de cada soro; Controle Negativo (CN), ancilostomídeos, *Ascaris* sp., *S. stercoralis* e *T. trichiura*.

POSIÇÃO	PREDIÇÃO	PESO MOLECULAR	CN	ANCILOSTOMÍDEOS	ASCARIS SP.	S. STERCORALIS	T. TRICHIURA
A01	<i>Ancylostoma</i>	1497.819799	5353	3893.75	18691	2337.75	803.25
B01	<i>Ancylostoma</i>	1576.638322	1056	2073.75	2933	6097.75	736.25
C01	<i>Ancylostoma</i>	1542.632842	1497	1984.75	2033	4259.75	365.25
D01	<i>Ancylostoma</i>	1512.794313	5727	2917.75	20670	4742.75	894.25
E01	<i>Ancylostoma</i>	1380.661526	1404	800.75	4955	3569.75	275.25
F01	<i>Ancylostoma</i>	1446.642223	354	631.75	431	2281.75	295.25
G01	<i>Ancylostoma</i>	1483.75653	4826	1942.75	5088	2468.75	397.25
H01	<i>Ancylostoma</i>	1382.505143	41	92.75	59	974.75	149.25
I01	<i>Ancylostoma</i>	1470.740839	944	3021.75	9676	4596.75	380.25
J01	<i>Ancylostoma</i>	1620.750064	285	336.75	962	1091.75	118.25

6.4 Seleção de peptídeos

Nenhum peptídeo foi encontrado reativo para todos os pools de soros simultaneamente, mesmo utilizando os intervalos de 2σ e 3σ desvios padrão. Entretanto, foram encontrados peptídeos específicos, utilizando o intervalo de 3σ desvios padrão (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Peptídeos específicos. Número de peptídeos reativos que se demonstraram potenciais alvos para diagnóstico específico.

Espécies	Peptídeos reativos específicos
<i>Ascaris</i> sp.	41
<i>Trichuris trichiura</i>	0
Ancilostomídeos	13
<i>Strongyloides stercoralis</i>	26

Tabela 4: Resultados da densitometria para peptídeos específicos. As colunas “Peptídeo” corresponde a posição dos peptídeos na membrana quanto ao sintetizador. Na coluna “Sequência” demonstra a sequência de aminoácidos que compõem o peptídeo. A coluna “Peso Molecular” demonstra o peso molecular dos peptídeos e a seguintes colunas os valores dos resultados de densitometria de cada soro; (CN) Controle Negativo, e a espécie de interesse. A última coluna mostra a intensidade relativa (IR) que é dada pela razão entre o valor de densitometria do *spot* reativo para o pool de soros positivos (VDP), e o valor da leitura de densitometria do mesmo *spot* quando utilizado o pool de soros negativos (VDN). Através da fórmula: $IR = VDP / VDN$, que demonstra o quanto aquele *spot* seria mais reativo para o soro positivo que para o soro negativo.

PEPTÍDEO	PESO MOLECULAR	CN	ANCILOSTOMÍDEOS	IR
C47	1637,776428	3584	19396,25	5,4119
E36	1481,711703	6152	16255,25	2,642271
F34	1701,830198	4596	12066,25	2,625381
F44	1776,814605	5727	29629,25	5,173607
G49	1712,785992	3753	16678,25	4,443978
H35	1719,906321	8182	13428,25	1,641194
K33	1556,696114	6567	16742,25	2,549452
K40	1693,875415	6734	21884,25	3,249814
K57	1521,779392	8111	11870,25	1,463476
M33	1531,712098	5456	15083,25	2,764525
O42	1769,906715	5359	23720,25	4,426246
P39	1670,856929	5336	22935,25	4,29821

PEPTÍDEO	PESO MOLECULAR	CN	ASCARIS SP.	IR
A01	1497,819799	5353	18691	3,491687
A29	1406,679677	2235	12631	5,651454
B08	1531,712098	2032	13907	6,843996
C17	1659,784592	6045	24563	4,063358
D01	1512,794313	5727	20670	3,609219
D22	1530,733444	5124	16393	3,199258
D32	1732,728201	1345	14929,5	11,1
E02	1759,874746	3632	16027	4,41272
E09	1701,830198	3945	21459	5,439544
E13	1328,657878	3317	17101	5,155562
E14	1369,684428	5059	16134	3,189168
E28	1397,679343	3476	12226	3,517261
F10	1626,75055	2208	13015	5,894475
G14	1615,708073	5026	12321	2,451452
G25	1332,715669	3024	13343	4,412368
G30	1422,729604	2447	19874	8,121782
H08	1831,918343	4811	26769	5,564124
H12	1401,649103	7702	31627	4,106336
H15	1645,831819	1822	11730	6,43798
I06	1668,778402	3988	17960	4,503511
J02	1470,740839	1477	11732	7,943128
J19	1603,78574	2748	19477	7,0877
J24	1332,715669	1753	14459	8,248146
J30	1458,737468	3148	13173	4,184562
K14	1411,644687	5567	18246	3,277528
L21	1551,758931	2992	19621	6,557821
L27	1422,729604	2451	12840	5,238678
M13	1622,824567	3660	11809	3,226503
M25	1429,804818	3145	16717	5,315421
M29	1334,683699	1677	11801	7,036971
O16	1670,856929	4401	21941	4,985458
O25	1475,759994	5541	18141	3,273958
P03	1585,883461	3783	15360	4,06027
P24	1429,804818	2727	11881	4,356802
R05	1732,728201	344	19675	57,19477
R11	1481,711703	2912	13983	4,801854

R24	1475,759994	3959	15797	3,990149
R25	1420,768099	3031	14669	4,839657
S01	1487,712372	3796	16154	4,255532
S17	1552,799122	3729	22179	5,947707
T13	1665,746189	2701	37010	13,70233

PEPTÍDEO	PESO MOLECULAR	CN	STRONGYLOIDES	IR
C22	1808,606096	182	12671,75	69,625
E53	1438,549116	3325	17823,25	5,360376
F05	1613,696449	2264	12981,75	5,733989
I12	1714,725031	292	17541,75	60,07449
I46	1601,615814	415	20046,25	48,30422
J14	1717,678229	304	12336,75	40,58141
J33	1543,621568	1156	40301,25	34,86267
K54	1735,828465	7194	18499,25	2,571483
M52	1754,83428	4900	22249,25	4,540663
N41	1619,771227	6056	32863,25	5,42656
N51	1521,707956	6847	12764,25	1,864211
N52	1802,62586	732	11760,25	16,06592
O36	1714,725031	265	17711,25	66,83491
Q45	1659,723055	6559	12680,25	1,93326
R34	1601,72881	3107	17078,25	5,496701
R56	1613,787848	1530	30192,25	19,7335
S16	1670,770892	1635	14574,75	8,91422
S35	1812,737312	472	13742,25	29,11494
S54	1710,756608	1965	13031,25	6,631679
T15	1559,695779	950	16004,75	16,84711
F54	1746,73798	3869	16980,25	4,388796
H51	1674,774364	1504	27094,25	18,01479
I39	1493,719098	4722	20459,25	4,332751
K02	1510,640515	592	12922,75	21,82897
Q53	1604,663099	1662	25481,25	15,33168
T51	1552,664813	4297	32742,25	7,619793

A última seleção foi para os peptídeos reativos para cada pool de soro de pacientes com diferentes helmintíases, não importando sua reatividade com os demais soros (Figura 7). Assim, encontramos por exemplo peptídeos reativos para *Ascaris* sp., mas que também podem ser reativos com outro soro, menos com o controle negativo, sendo bons alvos para um pan-diagnóstico.

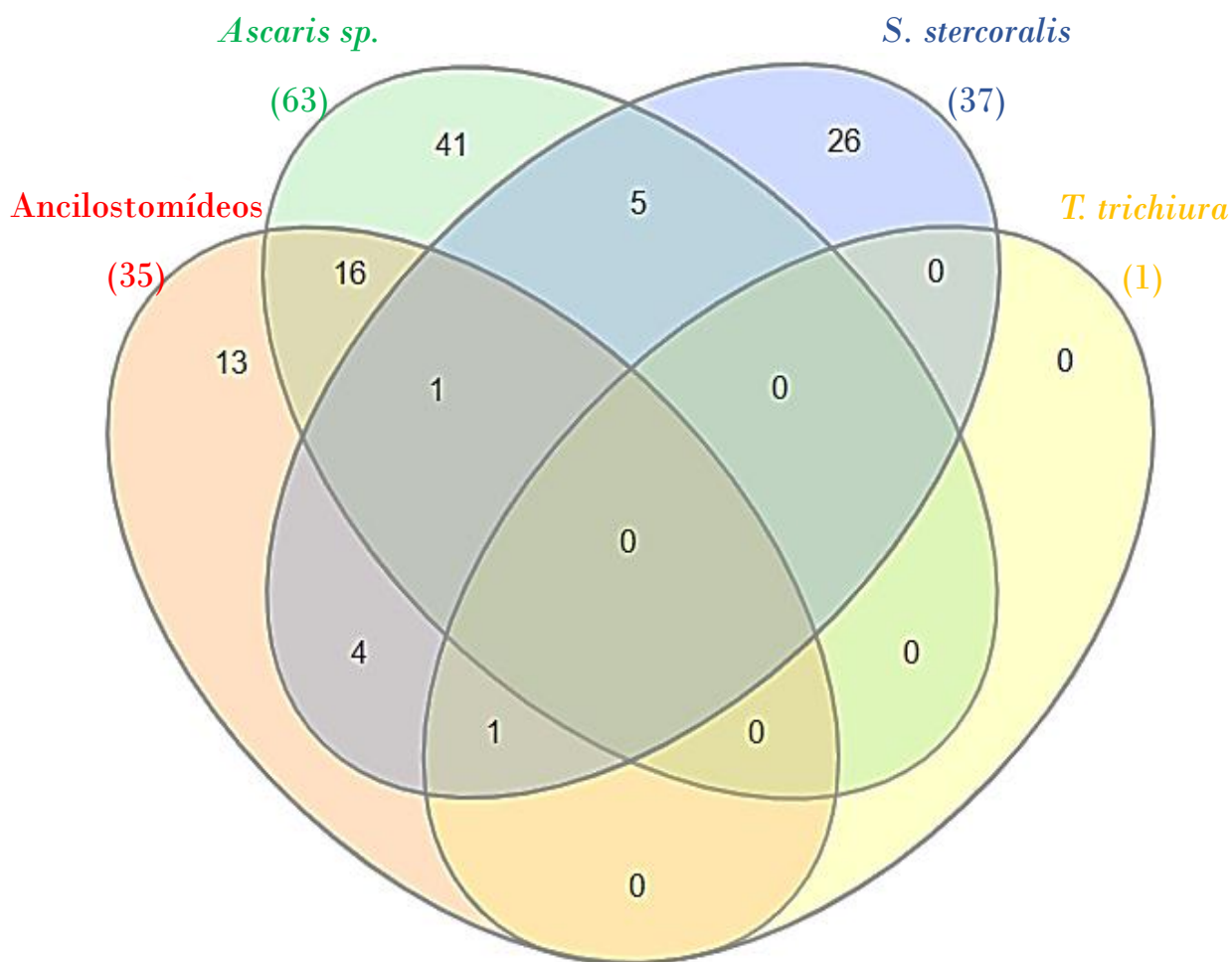


Figura 7: Diagrama de Venn. Demonstração do número de peptídeos específicos para cada espécie de geohelminto e também peptídeos que se demonstram conservados em mais de uma espécie.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi empregado o uso das técnicas de bioinformática para a seleção de peptídeos antigênicos, a partir do proteoma predito das espécies *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis* e as duas espécies de ancilostomídeos, *A. duodenale* e *N. americanus*, afim de obter potenciais biomarcadores para utilização e otimização do diagnóstico imunológico desses geohelminhos. Dessa forma, os peptídeos que conseguimos selecionar através da predição foram submetidos a um teste de reatividade com soros positivos para tais espécies.

Os helmintos constinuem um grupo vasto de espécies e, dentre eles se encontram o filo Nematoda, que engloba os geohelminhos de importância médica de interesse nesse estudo. Devido à proximidade filogenética das espécies, nós optamos por fazer um BLASTp contra as sequências do proteoma de outros helmintos que poderiam apresentar reação cruzada. Partindo dessa ideia inicial, foi realizado a busca não apenas de peptídeos que servissem para um diagnóstico específico, mas também por sequências conservadas entre *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis* e os ancilostomídeos, ou seja por peptídeos que pudessem ser utilizados para o diagnóstico dessas múltiplas espécies simultaneamente.

A escolha dos nematódeos *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis* e as duas espécies de ancilostomídeos, *A. duodenale* e *N. americanus*, se deu devido a sua grande importância epidemiológica, onde são referidos como os geohelminhos mais prevalentes em infecções humanas (BETHONY, et al. 2006; WHO, 2021). A prevalência mundial chega a 1.5 bilhões de infectados, sendo que em 2010 cerca de 439,9 milhões de pessoas foram infectadas por ancilostomídeos, 819,0 milhões infectadas por *A. lumbricoides* e 464,4 milhões com *T. trichiura* (PULLAN, et al. 2014). Uma revisão sistemática publicada em 2021 aponta que *S. stercoralis* afeta aproximadamente 300 milhões de pessoas, demonstrando que a infecção ainda é um problema de saúde pública mundial (SLAHI, et al. 2021). Diante dos prejuízos de saúde e econômicos ocasionados a população, a OMS tem implantado programas de controle para as geohelmintíases, voltado para a quimioterapia preventiva voltada para as populações de risco desde 2001, de 2011-2020 ampliaram o plano estratégico, abrangendo a cobertura das regiões tratadas. Entretanto, as reais implicações dessa estratégia não são totalmente conhecidas, devido à dificuldade na aplicação de métodos de diagnóstico disponíveis em larga escala (MS, 2018; WHO, 2012; 2021). O plano estratégico de 2021-2030 foi implementado

preconizando metas globais até 2030, que incluem, controle e eliminação das geohelmintíases em crianças de idade pré-escolar e escolar, redução do número de comprimidos necessários na quimioterapia preventiva e estabelecimento de um programa de controle para geohelmintíases que seja eficaz (WHO, 2021) No entanto, aspectos como o surgimento de resistência aos derivados do benzimidazol e a eficácia dessas ações por meio da avaliação das taxas de cura, raramente são considerados. Esses aspectos são de extrema importância para orientar e direcionar as intervenções, de modo a implementar medidas de controle personalizadas em cada região e com melhor custo-benefício (GABRIELLI, et al. 2013). As metas implementadas só serão alcançadas melhorando a estratégia atual, incluindo além da melhora de infraestrutura, educação e tratamento, o diagnóstico que avaliaria o risco de exposição, daria melhor direcionamento ao programa, indicando os indivíduos para tratamento, e além disso, faria o acompanhamento da resolução da estratégia implementada e o progresso obtido. Desta forma, fazem-se necessários marcadores de prognóstico, capazes de identificar se o tratamento foi eficaz.

As espécies de geohelminthos listadas no presente trabalho são tratadas como um grupo por utilizarem métodos de diagnóstico parasitológico semelhantes, por responderem aos mesmos medicamentos(benzimidazólicos) e também pela sobreposição geográfica (BETHONY, et al. 2006; WHO, 2021). A espécie *S. stercoralis* possui algumas características peculiares, requer métodos de diagnóstico diferentes dos outros geohelminthos e, por isso frequentemente não é identificado em exames de fezes de rotina laboratorial, além de não ser sensível aos medicamentos albendazol e mebendazol, que são utilizados em prevenção em larga escala, o que dificulta também o controle por meio da quimioterapia preventiva (REQUENA-MÉNDEZ et al. 2013; HOTEZ, 2017; WHO, 2021). A sorologia pode auxiliar consideravelmente no diagnóstico de *S. stercoralis*, em caso onde os métodos convencionais possuem baixa sensibilidade. Desta forma, no presente trabalho, identificamos 26 peptídeos específicos para *S. stercoralis* que podem constituir importantes marcadores para a identificação correta desta infecção helmíntica.

A triagem *in silico* dos proteomas preditos destas espécies por meio do *software* Immunorank levou a um número considerável de antígenos que foram sintetizados pela técnica de *spot-síntese* seguida do *Immunoblotting*, permitindo que fosse realizada a triagem sorológica desse grande volume de dados em um único experimento (FRANK, 1992). Dessa forma, os 1160 peptídeos selecionados com maior grau de imunogenicidade pelo Immunorank foram testados no *Immunoblotting* com o pool de soros de humanos

infectados por *Ascaris*, ancilostomídeos e *T. trichiura*, e de soros de camundongo infectados por *S. venezuelenses*. Possivelmente os antígenos reconhecidos por soros de animais e humanos infectados, seriam potenciais alvos para uso no diagnóstico. A inclusão de soros humanos infectados por esses parasitos é de extrema relevância, pois simula a realidade encontrada em campo, como a existência de anticorpos de infecções passadas, poliparasitismo, diferentes cargas parasitárias e a intensidade de resposta imunológica. Afim de estudar melhor as particularidades de cada indivíduo, será realizado futuramente testes desses antígenos com amostras individuais destes soros.

Com os ensaios de *Immunoblotting* foi possível selecionar um total de 107 peptídeos, sendo 80 específicos, 41 para *Ascaris* sp., 13 para ancilostomídeos e 26 para *S. stercoralis*. Foram obtidos 27 alvos que reagiram simultaneamente para duas ou mais espécies. Estes resultados nos levam a uma série de pensamentos e discussões quando vimos que não foi encontrado nenhum peptídeo específico reativo para *T. trichiura* e que foi encontrado apenas 1 que fosse reativo para ele e outras espécies. Ao observar as membranas após *Immunoblotting* com o pool de soros de *T. trichiura*, vimos que os *spots* apresentaram pouca reatividade, isso pode ter ocorrido devido aos níveis baixos de anticorpos IgG produzidos durante a infecção, mas pode ser que ao testar para outras diferentes classes de anticorpos como IgA e IgE obtenhamos resultados mais promissores (BUNDY, et al. 1991; FAULKNER, et al. 2002). Alguns estudos relataram também que a produção de anticorpos na infecção por *T. trichiura* pode oscilar consideravelmente de acordo com a idade e com a intensidade da infecção que na maioria dos casos é baixa, isso também pode explicar a baixa reatividade aos peptídeos na membrana (BUNDY, et al. 1991; FAULKNER, et al. 2002).

Com relação ao tratamento, *T. trichiura* é uma espécie que demonstra baixa sensibilidade as dosagens de benzimidazólicos utilizados nos programas de intervenções, sendo insatisfatório doses únicas dos anti-helmínticos (HOTEZ, 2017; ELSE, et al. 2020). Esses aspectos e características peculiares desses parasitos, demonstram o quanto é importante o acompanhamento e monitoramento da eficácia dos programas de controle nas regiões intervindas por meio do diagnóstico (MBONG, et al. 2020). Tais programas de intervenção devem incluir e implementar medições de eficácia em larga escala, para avaliação do progresso obtido, e isso só será possível por meio do uso de ferramentas e estratégias de diagnóstico mais eficazes. Desta forma, pretendemos realizar novas

avaliações relativas à seleção de alvos para o diagnóstico de *T. trichiura*, especialmente visando a avaliação de prognóstico da eficácia do tratamento.

Existe uma grande discussão relativa ao uso do diagnóstico parasitológico ou sorológico para infecções helmínticas. Nos locais onde a quimioterapia preventiva foi aplicada é comum casos de baixa carga parasitaria, dificultando o diagnóstico por meio do exame parasitológico de fezes, além do mais, esses métodos são de difícil aplicação em grandes estudos populacionais, mas ainda assim a microscopia de fezes é amplamente utilizada (KNOPP, et al., 2008; MBONG, et al. 2020). Outro ponto a considerar é a intermitência na eliminação de ovos ou larvas nas fezes o que torna o diagnóstico parasitológico ainda mais difícil. Infelizmente, essas infecções em sua maioria permanecem sem diagnóstico devido à falta de profissionais treinados e tecnologias mais apropriadas (KHURANA & SETHI, 2017). Todos os métodos disponíveis apresentam limitações em relação à necessidade de mão de obra especializada, sensibilidade e especificidade, custo benefício e infraestrutura como nos métodos moleculares.

Os testes imunológicos para detecção de antígenos e anticorpos surgem como uma ótima alternativa, podendo auxiliar no diagnóstico de infecções iniciais e em casos de fezes negativas ao exame parasitológico de fezes, funcionando como método de triagem para as técnicas parasitológicas. Pensando nos testes imunológicos como método de triagem seria possível otimizar o tempo da entrega de resultados além de auxiliar nas condições em que a infecção não é identificada pela microscopia, por diversos fatores como; intermitência na postura de ovos, infecções recentes e de baixa intensidade. Assim, a busca por um teste diagnóstico sorológico que seja capaz de identificar as espécies de geohelmintos simultaneamente é de extrema importância, afim de utiliza-lo como método de triagem em grandes números amostrais.

Uma das desvantagens associadas ao sorodiagnóstico estão relacionadas ao fato de que as imunoglobulinas produzidas durante a infecção podem permanecer persistentes após o tratamento e, deste modo, podem não indicar infecção ativa, não discriminando infecções presentes de passadas (REQUENA-MÉNDEZ, et al. 2013; KHURANA & SETHI, 2017). Por outro lado, a detecção de anticorpos é de extrema relevância em casos onde a infecção passa por estágio assintomático ou onde não houve liberação de ovos nas fezes analisadas. Há de se pontuar também que podem ser rastreados antígenos que se demonstrem mais reativos apenas em infecções ativas, sendo um indicativo da presença do parasito. Durante as infecções helmínticas pode ser desencadeada a produção de

células de memória e um aumento da produção de imunoglobulinas, as quais sofrem queda após cura e expulsão do parasito (BUNDY, et al. 1991; FAULKNER, et al. 2002). Essas imunoglobulinas que se demonstrem elevadas durante a infecção ativa podem ser rastreadas para a determinação da presença do parasito, e para isso seria necessária a avaliação da queda da titulação de anticorpos e a janela de detecção (KARUNAJEEWA, et al. 2006). Os antígenos também poderiam ser utilizados para a produção de anticorpos policlonais, e através destes seria possível identificar antígenos do parasito, o que também comprovaria a infecção ativa (JOHNSON, et al. 1996; BUNGIRO et al. 2005).

Mesmo diante das limitações dos testes sorológicos, eles ainda são uma ótima alternativa para serem utilizados como métodos de triagem em grandes populações, auxiliando na avaliação da exposição e no direcionamento dos programas de controle, como no tratamento. Dessa forma facilitaria a testagem em massa e tratamento somente dos casos positivos, reduzindo custos e mão de obra. Caso contrário a não utilização de um método de triagem, só restaria além da melhoria da infraestrutura e educação, o tratamento em massa de toda a população, que além de aumentar gastos também aumentaria o risco de seleção de isolados resistentes aos anti-helmínticos disponíveis para as infecções em humanos, como já ocorre na veterinária em criações de ruminantes (WOLSTENHOLME, et al. 2004; KENYON, et al. 2009; TINKLER, 2020). O risco da ocorrência de resistência aos anti-helmínticos deve ser um fator importante a se considerar, visto que há poucos medicamentos disponíveis e em desenvolvimento (PANIC et al. 2014).

Neste estudo foram identificados vários peptídeos antigênicos que demonstraram ser alvos promissores para serem utilizados no diagnóstico de geohelmintos, e a bioinformática tem se demonstrado de extrema importância para o rastreamento desses antígenos. Considerando que as limitações dos métodos utilizados para o diagnóstico de infecções helmínticas podem interferir no monitoramento dos programas de intervenção e, portanto, restringir a avaliação da eficácia, há a necessidade de novos testes de diagnóstico que sejam eficazes, práticos na utilização em campo e de baixo custo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Visamos a produção de uma proteína quimera, composta por diferentes peptídeos objetivando o desenvolvimento de um teste rápido para ser utilizado como método de triagem em grandes estudos populacionais como nos programas de intervenção. O principal objetivo é que esse teste possa ser empregado com facilidade em campo, e que possa alcançar as populações desprovidas de recursos, que é a realidade da grande maioria dos indivíduos que sofrem com essas morbidades, e assim auxiliar no controle e eliminação dessas doenças.

REFERÊNCIAS

ABRÀMOFF, M. D., MAGALHÃES, P. J., RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics international**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

AZEVEDO, E. P., ALMEIDA, E. M., MATOS, J. S., RAMOS, A. R., SIQUEIRA, M. P., FONSECA, A. B. M., UCHÔA, C. M. A. Diagnóstico parasitológico em amostras fecais no laboratório de análises clínicas: comparação de técnicas e custo de implantação. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 4, p. 401-407, 2017.

BASUNI, M., MUHI, J., OTHMAN, N., VERWEIJ, J. J., AHMAD, M., MISWAN, N., NOORDIN, R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 338-343, 2011.

BIGGS, B. A., CARUANA, S., MIHRSHAHI, S., JOLLEY, D., LEYDON, J., CHEA, L., NUON, S. Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful? **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 5, p. 788-791, 2009.

BECKER, S. L., LIWANAG, H. J., SNYDER, J. S., AKOGUN, O., BELIZARIO JR, V., FREEMAN, M. C., LEVECKE, B. Toward the 2020 goal of soil-transmitted helminthiasis control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006606, 2018.

BEHRENDT, R., WHITE, P., OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 1, p. 4-27, 2016.

BETHONY, J., BROOKER, S., ALBONICO, M., GEIGER, S. M., LOUKAS, A., DIEMERT, D., & HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **The lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-1532, 2006.

BOOTH, M., VOUNATSOU, P., N'GORAN, E. K., TANNER, M., UTZINGER, J. The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing *Schistosoma mansoni* and hookworm co-infections in rural Côte d'Ivoire. **Parasitology**, v. 127, n. 6, p. 525-531, 2003.

BUNDY, D. A., LILLYWHITE, J. E., DIDIER, J. M., SIMMONS, I., BIANCO, A.E. Dependência da idade do estado de infecção e níveis de anticorpos séricos na infecção por tricurídeos humanos (*Trichuris trichiura*). **Parasite immunology**, v. 13, n. 6, pág. 629-638, 1991.

BUNGIRO JR, RICHARD D.; CAPPELLO, MICHAEL. Detection of excretory/secretory coproantigens in experimental hookworm infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 5, p. 915-920, 2005.

CARVALHO, G. L. X. D., MOREIRA, L. E., PENA, J. L., MARINHO, C. C., BAHIA, M. T., MACHADO-COELHO, G. L. L. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 80-84, 2012.

CHEN, X., ZARO, J. L., SHEN, W. Fusion protein linkers: property, design and functionality. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357-1369, 2013.

CHU, B. K., GASS, K., BATCHO, W., DORKENOO, A. M., ADJINACOU, E., MAFI, E., & ADDISS, D. G. Pilot assessment of soil-transmitted helminthiasis in the context of transmission assessment surveys for lymphatic filariasis in Benin and Tonga. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2708, 2014.

CORREIA, Maria Sonia Barros Barbosa. **Probabilidade e estatística**. 2003.

COOLS, P., VLAMINCK, J., ALBONICO, M., AME, S., AYANA, M., ANTONIO, B. P. J., MAYA, C. Diagnostic performance of a single and duplicate Kato-Katz, Mini-FLOTAC, FECPAKG2 and qPCR for the detection and quantification of soil-transmitted helminths in three endemic countries. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007446, 2019.

CHIEFFI, P. P, AMATO NETO, V. Vermes, verminoses e a saúde pública. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 41-43, 2003.

CRINGOLI, G. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. **Parassitologia**, v. 48, n. 3, p. 381-384, 2006.

DOS SANTOS, L. M., DONASSOLO, R. A., BERNE, M. E., LEITE, F. P. L., DA COSTA AVILA, L. F., SCAINI, C. J., CONCEIÇÃO, F. R. The serodiagnostic potential

of recombinant proteins TES-30 and TES-120 in an indirect ELISA in the diagnosis of toxocariasis in cattle, horses, and sheep. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0213830, 2019.

DHOM-LEMONS, L., VIANA, A. G., CUNHA, J. L. R., CARDOSO, M. S., MENDES, T. A. O., PINHEIRO, G. R. G., GUIMARÃES-CARVALHO, S. F. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 2019.

ELSE, K.J., KEISER, J., HOLLAND, C.V., GRENCIS, R.K., SATTELLE, D.B., FUJIWARA, R.T., BUENO, L.L., ASAOLU, S.O., SOWEMIMO, O.A., COOPER, P.J. Whipworm and roundworm infections. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1-23, 2020.

ENGVALL, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 419-439, 1980.

EBRAHIMI, M., SEYYEDTABAEI, S. J., RANJBAR, M. M., TAHVILDAR-BIDEROUNI, F., MAMAGHANI, A. J. Designing and Modeling of Multi-epitope Proteins for Diagnosis of *Toxocara canis* Infection. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1-10, 2019.

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.

FAULKNER, H., TURNER, J., KAMGNO, J., PION, S. D., BOUSSINESQ, M., BRADLEY, J. E. Age- and infection intensity-dependent cytokine and antibody production in human trichuriasis: the importance of IgE. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 5, p. 665-674, 2002.

GEORGE, S., GELDHOF, P., ALBONICO, M., AME, S. M., BETHONY, J. M., ENGELS, D., HUONG, N. T. The molecular speciation of soil-transmitted helminth eggs collected from school children across six endemic countries. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 11, p. 657-663, 2016.

GABRIELLI, A. F., MONTRESOR, A., NICHOLLS, R. S., AULT, S. K. Progress towards the control and elimination of neglected tropical diseases in Brazil. **J Pediatr (Rio J)**, v. 89, n. 3, p. 215-216, 2013.

GLINZ, D., SILUÉ, K. D., KNOPP, S., LOHOURIGNON, L. K., YAO, K. P., STEINMANN, P., UTZINGER, J. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 7, 2010.

JIANG, L., FENG, Z., ZHANG, Y. G., WANG, Z. Y. Serodiagnosis of the recombinant multi-epitope antigens from antigen B subunits of *Echinococcus granulosus*. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 31, n. 6, p. 438-442, 2013.

JOHNSON, M. J.; BEHNKE, J. M.; COLES, G. C. Detection of gastrointestinal nematodes by a coproantigen capture ELISA. **Research in veterinary science**, v. 60, n. 1, p. 7-12, 1996.

JOURDAN, P. M., LAMBERTON, P. H., FENWICK, A., ADDISS, D. G. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252-265, 2018.

HILPERT, K., WINKLER, D. F. H., HANCOCK, R. E. W. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nature protocols**, v. 2, n. 6, p. 1333, 2007.

HOTEZ, P. J., BRINDLEY, P. J., BETHONY, J. M., KING, C. H., PEARCE, E. J., JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1311-1321, 2008.

HOTEZ, P. J., BOTTAZZI, M. E., FRANCO-PAREDES, C., AULT, S. K., PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HOTEZ, Peter 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.

HOTEZ, PETER J. Global deworming: moving past albendazole and mebendazole. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 11, p. 1101-1102, 2017.

HOWL, JOHN (Ed.). **Peptide synthesis and applications**. Springer Science & Business Media, 2005.

HAWKINS, K. R., CANTERA, J. L., STOREY, H. L., LEADER, B. T., DE LOS SANTOS, T. Diagnostic tests to support late-stage control programs for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0004985, 2016.

KARUNAJEEWA, H., KELLY, H., LESLIE, D., LEYDON, J., SAYKAO, P., BIGGS, B. A. Parasite-specific IgG response and peripheral blood eosinophil count following albendazole treatment for presumed chronic strongyloidiasis. **Journal of Travel Medicine**, v. 13, n. 2, p. 84-91, 2006.

KEIZER, J. E UTZINGER, J. Eficácia dos medicamentos atuais contra infecções por helmintos transmitidas pelo solo: revisão sistemática e meta-análise. **Jama**, n. 16, p.1937-1948, 2008.

KATO, K. Comparative examinations. **Jpn J Parasitol**, v. 3, p. 35, 1954.

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

KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KEISER, J., UTZINGER, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 299, n. 16, p. 1937-1948, 2008.

KENYON, F. et al. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 1, p. 3-11, 2009.

KNOPP, S., MGENI, A. F., KHAMIS, I. S., STEINMANN, P., STOTHARD, J. R., ROLLINSON, D., UTZINGER, J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 11, p. e331, 2008.

KUDITHIPUDI, S., KUSEVIC, D., WEIRICH, S., JELTSCH, A. Specificity analysis of protein lysine methyltransferases using SPOT peptide arrays. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 93, p. e52203, 2014.

KHURANA, S., SETHI, S. Laboratory diagnosis of soil transmitted helminthiasis. **Tropical parasitology**, v. 7, n. 2, p. 86, 2017.

LAUNE, D., MOLINA, F., FERRIÈRES, G., VILLARD, S., BÈS, C., RIEUNIER, F., GRANIER, C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of immunological methods**, v. 267, n. 1, p. 53-70, 2002.

LIM, M. D., BROOKER, S. J., BELIZARIO JR, V. Y., GAY-ANDRIEU, F., GILLEARD, J., LEVECKE, B., NJENGA, S. M. Diagnostic tools for soil-transmitted helminths control and elimination programs: A pathway for diagnostic product development. 2018.

LO, N. C., ADDISS, D. G., HOTEZ, P. J., KING, C. H., STOTHARD, J. R., EVANS, D. S., RASO, G. A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e64-e69, 2017.

LUTZ, Adolpho. *Schistosomum mansoni* and Schistosomiasis observed in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.

MACHICADO, J. D., MARCOS, L. A., TELLO, R., CANALES, M., TERASHIMA, A., GOTUZZO, E. Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonic community of Peru using multiple diagnostic techniques. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 6, p. 333-339, 2012.

MEDLEY, G. F., TURNER, H. C., BAGGALEY, R. F., HOLLAND, C., HOLLINGSWORTH, T. D. The role of more sensitive helminth diagnostics in mass drug administration campaigns: elimination and health impacts. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, p. 343-392, 2016.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Prático para o Controle das Geohelmintíases**, 2018. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_controle_geohelmintias.pdf>.

MBONG N. M., PRINCE M. G., NGUEMA MOURE, P. A., RAMHARTER, M., ESEN, M., ADÉGNKA, A. A. Diagnostic techniques of soil-transmitted helminths: Impact on control measures. **Tropical. Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n.2, p.93, 2020.

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

MUTOMBO, P. N., MAN, N. W., NEJSUM, P., RICKETSON, R., GORDON, C. A., ROBERTSON, G., MCLAWS, M. L. Diagnosis and drug resistance of human soil-transmitted helminth infections: A public health perspective. **Advances in parasitology**, v. 104, p. 247, 2019.

NIH. Protein Array Analyzer. <<https://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Protein%20Array%20Analyzer.txt>>.

NIKOLAY, B., BROOKER, S. J., PULLAN, R. L. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 11, p. 765-774, 2014.

NOORDIN, R., SMITH, H. V., MOHAMAD, S., MAIZELS, R. M., & FONG, M. Y. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 57-62, 2005.

OJHA, S. C., JAIDE, C., JINAWATH, N., ROTJANAPAN, P., BARAL, P. Geohelminths: public health significance. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 01, p. 005-016, 2014.

OPAS. **Diretrizes: Quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo contato com o solo em grupos de risco**. Washington, D.C.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018.

PABALAN, N., SINGIAN, E., TABANGAY, L., JARJANAZI, H., BOIVIN, M. J., EZEAMAMA, A. E. Soil-transmitted helminth infection, loss of education and cognitive

impairment in school-aged children: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0005523, 2018.

PANIC, G., DUTHALER, U., SPEICH, B., KEIZER, J. Medicamentos de reaproveitamento para o tratamento e controle de infecções por helmintos. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, pág. 185-200, 2014.

PAPAIKOVU, M., GASSER, R. B., LITTLEWOOD, D. T. J. Quantitative PCR-based diagnosis of soil-transmitted helminth infections: faecal or fickle? **Trends in parasitology**, 2019.

PULLAN, R. L., SMITH, J. L., JASRASARIA, R., BROOKER, S. J. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2014.

RAMADA, J. S., BECKER-FINCO, A., MINOZZO, J. C., FELICORI, L. F., DE AVILA, R. A. M., MOLINA, F., ALVARENGA, L. M. Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles antivenoms*. **Toxicon**, v. 73, p. 47-55, 2013.

RASHWAN, N., DIAWARA, A., SCOTT, M. E., PRICHARD, R. K. Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 496, 2017.

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**, v. 7, n. 1, p. e2002, 2013.

ROSANO, G. L., CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SCHÄR, F., TROSTDORF, U., GIARDINA, F., KHIEU, V., MUTH, S., MARTI, H., ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2288, 2013.

SAVIOLI, L., ALBONICO, M., DAUMERIE, D., LO, N. C., STOTHARD, J. R., ASAOLU, S., ANDERSON, R. M. Review of the 2017 WHO Guideline: Preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk population groups. An opportunity lost in translation. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 4, 2018.

SLAHI, A.V., BADRI, M., NAHAVANDI, K.H., HOUSHMAND, E., DALVAND, S., RIAHI, S.M., KHADEM VATAN, S. Prevalência de estrogiloidíase na população em geral do mundo: uma revisão sistemática e meta-análise. **Pathogens and Global Health**, p. 1-14, 2021.

SUN, P., GUO, S., SUN, J., TAN, L., LU, C., MA, Z. Advances in In-silico B-cell Epitope Prediction. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 105-115, 2019.

VIRGINIO, V. G., HERNANDEZ, A., ROTT, M. B., MONTEIRO, K. M., ZANDONAI, A. F., NIETO, A., FERREIRA, H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 132, n. 2, p. 309-315, 2003.

VLAMINCK, J., SUPALI, T., GELDHOF, P., HOKKE, C. H., FISCHER, P. U., & WEIL, G. J. Community rates of IgG4 antibodies to *Ascaris* haemoglobin reflect changes in community egg loads following mass drug administration. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, 2016.

VERWEIJ, J. J., BRIENEN, E. A., ZIEM, J., YELIFARI, L., POLDERMAN, A. M., & VAN LIESHOUT, L. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 4, p. 685-690, 2007.

TINKLER, STACY H. Preventive chemotherapy and anthelmintic resistance of soil-transmitted helminths—Can we learn nothing from veterinary medicine?. **One Health**, v. 9, p. 100106, 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.

TURNER, H. C., BETTIS, A. A., DUNN, J. C., WHITTON, J. M., HOLLINGSWORTH, T. D., FLEMING, F. M., & ANDERSON, R. M. Economic considerations for moving beyond the Kato-Katz technique for diagnosing intestinal parasites as we move towards elimination. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 6, p. 435-443, 2017.

TUYIZERE, A., NDAYAMBAJE, A., WALKER, T. D., BAYINGANA, C., NTIRENGANYA, C., DUSABEJAMBO, V., & HALE, D. C. Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection and other soil-transmitted helminths by cross-

sectional survey in a rural community in Gisagara District, Southern Province, Rwanda. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 3, p. 97-102, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Soil-transmitted helminthiasis—eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children. Soil-transmitted helminthiases progress report 2001–2010 and strategic plan 2011–2020**. World Health Organization, Geneva, 2012.

WHO: **Soil-transmitted helminth infections** 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes**. Geneva: World Health Organization, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers**. World Health Organization, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline: preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk population groups**. World Health Organization, 2017.

WHO EXPERT COMMITTEE. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 912, 2002.

WOLSTENHOLME, A. J., FAIRWEATHER, I., PRICHARD, R., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.

ZAHABIUN, F., SADJJADI, S. M., YUNUS, M. H., RAHUMATULLAH, A., MOGHADDAM, M. H. F., SAIDIN, S., NOORDIN, R. Production of *Toxocara cati* TES-120 Recombinant Antigen and Comparison with its *T. canis* Homolog for Serodiagnosis of Toxocariasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 319-325, 2015.

ANEXOS

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



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.