

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Comparação da infecção canina por diferentes espécies
de ancilostomídeos: aspectos parasitológicos, imunológicos
e moleculares

DENILSON EDUARDO SILVA CUNHA

Belo Horizonte
2009

DENILSON EDUARDO SILVA CUNHA

**Comparação da infecção canina por diferentes espécies
de ancilostomídeos: aspectos parasitológicos, imunológicos
e moleculares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Prof. Dra. Élide Mara Leite Rabelo
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Laboratório de Parasitologia Molecular

Belo Horizonte

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado até aqui.

Aos meus pais, Fábio e Terezinha, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Daniel e Diana, pelo companheirismo.

À minha orientadora, Prof.^a Élide Mara Leite Rabelo, por me aceitar como seu orientando, por seus ensinamentos (até do outro lado do mundo!!) que serão fundamentais para minha formação profissional e pela agradável convivência.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, por estar sempre disponível em me auxiliar nos experimentos, fornecer reagentes e sanar as dúvidas que surgissem.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular: Ariadna, Ana Flávia, Karina, Helen, Camila, Erlisson, Fábio, Rodrigo e, em especial, à Sílvia, Andreisa e a Carina, pela grande ajuda nos experimentos.

Aos amigos da turma de Mestrado: Ariadna, Diana, Diogo, Eduardo, Helen, Jailza, Luciana, Paula e Rízia, pela convivência e amizade, durante esses dois anos.

Aos amigos da graduação em Ciências Biológicas, em especial: André, Carlos, Diana, Graciela, Isabela, Luciana e Miriam, pelos momentos de diversão que passamos juntos.

À minha gerente no serviço de controle de zoonoses da regional Nordeste, Neyde Nunes Porto, pela compreensão e liberação do trabalho para a realização dos experimentos e para obtenção dos créditos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, na pessoa do coordenador Prof. Marcos Horácio.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Ao Sydney, por todo o trabalho de obtenção, tratamento, cuidado e sacrifício dos cães.

Ao Hudson, pela ajuda na identificação dos helmintos.

Ao Agenor, pela identificação das proteínas.

À Rosa e ao prof. Ricardo, por sempre me ajudarem e por me deixar usar o laboratório de vocês.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração e execução dessa dissertação.

RESUMO

A ancilostomose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo, infectando cerca de 740 milhões de pessoas em regiões rurais tropicais e subtropicais do mundo. Além de sua importância médica, estudos mostram que parasitos do gênero *Ancylostoma* continuam sendo um dos grupos de nematódeos mais freqüentes em infecções intestinais de cães e gatos. Há diversos grupos de moléculas produzidas e secretadas por ancilostomídeos (produtos ES - Excretados e Secretados) que garantem o sucesso de sua nutrição e permanência em seus hospedeiros, desencadeando respostas imunológicas nos mesmos. Para aprofundar nos aspectos envolvidos na relação com parasitos do gênero *Ancylostoma*, o modelo canino se torna o mais apropriado se comparado a outros modelos experimentais. Assim como nos ensaios de imunização, as proteínas de interesse para a análise proteômica são aquelas envolvidas na interface parasito-hospedeiro que modificam o ambiente modulando a resposta imune do segundo para garantir o desenvolvimento e sobrevivência do primeiro. Apesar de sua importância global, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos de interação parasito-hospedeiro, principalmente em relação aos aspectos imunológicos frente aos vermes adultos e às formas larvares. Nesse trabalho nos propomos a analisar, de forma comparativa, diferentes aspectos (parasitológicos, imunológicos e moleculares) da infecção canina por três espécies de ancilostomídeos: *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense*. Os resultados deste trabalho demonstram haver diferenças na eliminação de ovos nas fezes, no grau de anemia e na resposta imune do hospedeiro. Além disso, as análises proteômicas de extratos totais dos vermes em estudo demonstraram um grande número de antígenos compartilhados entre as espécies. Entretanto, para os proteomas de antígenos ES foi encontrado um número maior de proteínas espécie-específicas. Pelos caracteres morfológicos, *A. braziliense* e *A. ceylanicum* estão mais próximos entre si do que o *A. caninum*. Entretanto, na relação com o hospedeiro canino, avaliada pela resposta imune, *A. caninum* e *A. braziliense* mostraram-se mais próximos do que *A. ceylanicum*.

Palavras-chaves: *Ancylostoma*, cachorro, resposta imune, proteômica.

ABSTRACT

Ancylostoma is a cosmopolitan genus that infects humans and other animals. Some species are specific to man but others are zoonoses. The most widespread species is *Ancylostoma caninum*, a zoonotic parasite of dogs which develops, but does not become sexually mature, in humans, where it causes eosinophilic enteritis. *Ancylostoma ceylanicum* and *Ancylostoma braziliense* are also anthrozoönotic. Parasites from this family produce some key molecules important to the infection process and to the parasite surviving into his host. These products are excreted/secreted - E/S molecules produced by both, the larvae and adult stage. The host, on the other hand, try to control the infection by producing antibody directed against these molecules. In despite of the global importance of members of the Ancylostomatidae family very little information regarding the host/parasite interaction, mainly concerning the host immune response directed to the larvae and adult parasites, is available. In the present work we have compared three hookworms species: *A. caninum*, *A. ceylanicum* and *A. braziliense*, by analysing the parasitological infection, immune response and molecules involved in this mechanism, using the dog as the experimental model. The results have shown differences to the number of laid eggs, anaemia intensity and to the host immune response. Furthermore, the proteomic analysis has shown a great number of shared antigens between the three species. However, the ES protein profile presented a higher number of species specific proteins than of shared ones. Therefore, by analysing the morphological characters, one could assume that *A. braziliense* e *A. ceylanicum* are closer related than to *A. caninum*. However, when considering the interaction with the canine host, regarding the immune response, *A. caninum* and *A. braziliense* showed to be closer related between them, than to *A. ceylanicum*.

Key-words: *Ancylostoma*, dog, immune response, proteomics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição global da infecção humana por Ancilostomídeos.....	22
FIGURA 2: Curva de OPG da infecção causada pelas três espécies de <i>Ancylostoma</i>	56
FIGURA 3: Média de ovos liberados por grama de fezes para os três grupos experimentais.....	57
FIGURA 4: Porcentagem média de recuperação de vermes adultos em relação à quantidade de larvas L ₃ ingeridas por grupo experimental.....	59
FIGURA 5: Contagem média de hemácias ao longo da infecção canina para as três espécies de ancilostomídeos.....	60
FIGURA 6: Contagem média de leucócitos ao longo da infecção canina para as três espécies de ancilostomídeos.....	61
FIGURA 7: Títulos de anticorpos IgG total frente aos antígenos totais de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos ao longo da infecção.....	64
FIGURA 8: Títulos de anticorpos IgG total frente aos antígenos secretados e excretados de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos ao longo da infecção.....	66
FIGURA 9: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando o perfil protéico de extratos totais de larvas L ₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....	68

FIGURA 10: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando o perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....69

FIGURA 11: Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata mostrando o perfil protéico de extratos totais de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....70

FIGURA 12: Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata mostrando o perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....71

FIGURA 13: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos totais de larva de terceiro estágio para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição.....74

FIGURA 14: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos totais de vermes adultos para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição.....75

FIGURA 15: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos ES de larva de terceiro estágio para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição.....76

FIGURA 16: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos ES de vermes adultos para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição.....77

FIGURA 17: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando as bandas de interesse para identificação por espectrometria de massa do perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....78

FIGURA 18: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando as bandas de interesse para identificação por espectrometria de massa do perfil protéico de extratos totais de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....79

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1: Principais espécies de parasitos do gênero <i>Ancylostoma</i> : com suas características morfológicas e morfométricas e hospedeiros definitivos.....	18
TABELA 1: Infecção do grupo <i>Ancylostoma braziliense</i> segundo o peso por animal.....	42
TABELA 2: Infecção do grupo <i>Ancylostoma caninum</i> segundo o peso por animal.....	43
TABELA 3: Infecção do grupo <i>Ancylostoma ceylanicum</i> segundo o peso por animal.....	43
TABELA 4: Quantidade de vermes recuperados por sexo por animal para cada grupo infectado pelas diferentes espécies.....	58
TABELA 5: Porcentagem de recuperação de vermes adultos em relação à quantidade de larvas L ₃ ingeridas por animal para os 3 grupos experimentais.....	58
TABELA 6: Dosagem das proteínas excretadas e secretadas e das proteínas totais de larvas L ₃ e de vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos.....	62
TABELA 7: Resultados obtidos com a análise dos espectros gerados pelo espectrômetro de massa das proteínas de interesse dos perfis de produtos ES e de extratos totais de larvas e vermes adultos para as três espécies de ancilostomídeos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AceES1 – proteína secretada número 1 de *A. ceylanicum*

Ag - antígeno

ASP – *Ancylostoma Secreted Protein*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – albumina sérica bovina

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

DAI – dias após a infecção

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme lynked immunossorbent assay*

ES – *excreted-secreted*

EST – *Expressed Sequence Tags*

g - gravidade

HCl – ácido clorídrico

HRP – horseradish peroxidase

kDa - kiloDalton

kV – kilovolt

LMC – Larva *Migrans* Cutânea

L₃ – larva de terceiro estágio

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetros

µM – micromolar

Mb - megabase

mL – mililitro

mm – milímetros

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

MS – *mass spectrometry*

NCBI – *National Center for Biotechnology*

ng – nanograma

OPD – O-fenilenodiamino

OPG – ovos por grama
PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis
PBS - *phosphate buffer saline*
PBST20 - *phosphate buffer saline* com Tween 20
p/v – peso por volume
pI – ponto isoelétrico
pb – pares de base
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
pH – potencial hidrogeniônico
PM – padrão de peso molecular
rpm – rotações por minuto
SDS – duodecil sulfato de sódio
UV – luz ultra violeta
v/v – volume por volume

SUMÁRIO:

AGRADECIMENTOS.....	03
RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. MORFOLOGIA E POSIÇÃO TAXONOMICA DOS ANCILOSTOMÍDEOS.....	17
1.2. CARACTERISTICAS DAS ESPECIES DESTE TRABALHO.....	19
1.3. CICLO BIOLÓGICO.....	19
1.4. OCORRÊNCIA E PREVALÊNCIA.....	22
1.5. RESPOSTA IMUNE.....	23
1.6. PRODUTOS DE EXCREÇÃO-SECREÇÃO (ES).....	26
1.7. GERAÇÃO DE VACINAS.....	29
1.8. PROTEÔMICA.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS.....	39
4. METODOLOGIA.....	41
4.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>ANCYLOSTOMA</i>	41
4.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>ANCYLOSTOMA</i>	41
4.3 INFECÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.4 COLETA DE SANGUE.....	44
4.5 CONTAGEM DE HEMÁCIAS.....	44
4.6 CONTAGEM GLOBAL DE LEUCÓCITOS.....	44
4.7 OPG.....	45
4.8 COPROCULTURA/ BAERMANN.....	45
4.9 PREPARAÇÃO DAS LARVAS.....	45
4.10 OBTENÇÃO DOS VERMES ADULTOS.....	46
4.11 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS ES DE LARVAS.....	46
4.12 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS ES DE VERMES ADULTOS.....	47
4.13 PRODUÇÃO DE EXTRATO TOTAL.....	47
4.14 DOSAGEM DOS ANTÍGENOS PRODUZIDOS.....	48
4.15 OBTENÇÃO DOS PERFIS PROTÉICOS.....	48

4.16 TESTES IMUNOLÓGICOS.....	49
4.16.1 ELISA.....	49
4.16.2 WESTERN-BLOT.....	50
4.17 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	52
4.17.1 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS E PREPARO DAS AMOSTAS.....	52
4.17.2 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS.....	53
4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 ELIMINAÇÃO DE OVOS NAS FEZES (OPG).....	55
5.2 RECUPERAÇÃO DE VERMES ADULTOS.....	57
5.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	60
5.4 DOSAGEM DOS ANTÍGENOS TOTAIS E ES DE LARVAS L ₃ E DE VERMES ADULTOS.....	62
5.5 RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	63
5.6 PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS PROTEOMAS DE LARVAS L ₃ E DE VERMES ADULTOS.....	67
5.7 PERFIS IMUNOGÊNICOS.....	72
5.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	78
6. DISCUSSÃO.....	83
7. CONCLUSÕES.....	95
8. PERSPECTIVAS.....	99
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A ancilostomose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo, infectando cerca de 740 milhões de pessoas em regiões rurais tropicais e subtropicais do mundo (DE SILVA et al., 2003). É uma parasitose que acomete os países em desenvolvimento nos quais as pessoas sobrevivem com menos de dois dólares por dia e onde as condições sanitárias são precárias. A situação mais grave encontra-se na África sub-Sahariana, mas com alta prevalência também no sudeste da Ásia, China, Brasil e América Central (HOTEZ et al., 2005).

Entre os ancilostomídeos parasitos do homem destacam-se o *Ancylostoma caninum*, *A. braziliensis*, *A. ceylanicum*, *A. duodenale* e *Necator americanus* (BUNGIRO et al., 2004; HOTEZ et al., 2004). Destes, *N. americanus* é o agente etiológico predominante nas ancilostomoses humanas (HOTEZ et al., 2004). *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliensis* são infectantes para os seres humanos, sendo considerados agentes zoonóticos, mas de pouca importância na saúde pública (HOTEZ et al., 2004).

Os principais sinais clínicos da infecção no homem por ancilostomídeos incluem anemia ferropriva (principal sintoma) e enteropatias por perda de proteínas que podem levar ao retardo no crescimento físico e mental com conseqüências graves principalmente para as crianças em idade escolar. Esse quadro agrava-se devido ao grande tempo de permanência destes helmintos no hospedeiro que pode chegar a sete anos (PROCIV & CROESE, 1990). Vale lembrar que os sintomas só aparecem em infecções moderadas (carga parasitária acima de 2000 ovos por grama de fezes, opg) e graves (carga parasitária acima de 4000 opg) (CROMPTON, 2000).

Outro grupo que merece atenção é o de mulheres grávidas já que a infecção neste período traz conseqüências graves tanto para a mãe quanto para o recém-nascido. Há uma estimativa de que 44 milhões de casos de ancilostomose ocorram durante a gravidez (CROMPTON, 2000).

O diagnóstico clássico da infecção é feito a partir da contagem de ovos nas fezes por microscopia óptica. Estudos nessa área são raros, embora tentativas de aprimoramento do diagnóstico tenham sido realizadas, como o desenvolvimento de métodos de ELISA que detectam antígenos excretados

pelo parasito nas fezes do hospedeiro antes mesmo do período de patência ser alcançado (BUNGIRO e CAPPELLO, 2005).

Embora tratamentos anti-helmínticos com benzimidazóis sejam eficazes na eliminação de vermes adultos, reinfeções ocorrem rapidamente (4 a 12 meses após o tratamento) (ALBONICO et al., 1995; QUINNELL et al., 1993). Além disso, diferentemente de outras helmintoses transmitidas pelo solo, a infecção por ancilostomídeos possui uma particularidade: a carga parasitária aumenta com a idade do hospedeiro em regiões endêmicas (BETHONY et al., 2002). Estes dados sugerem que os parasitos possam evadir ou suprimir a resposta imunológica do hospedeiro (LOUKAS & PROCIV, 2001).

As medidas de controle hoje disponíveis são o tratamento em massa e periódico das áreas endêmicas com benzimidazóis (principalmente em crianças em idade escolar) e o estabelecimento de condições sanitárias básicas para a população, como o suprimento adequado de água para consumo humano (BROOKER et al., 2005). Devido à falha nos programas de controle da doença baseados no tratamento em massa e a preocupante emergência de resistência às drogas anti-helmínticas em consequência da frequência de uso, surge, no desenvolvimento de uma vacina, uma alternativa para o controle desta parasitose (HOTEZ et al., 1999).

1.1. Morfologia e posição taxonômica dos ancilostomídeos

O *Ancylostoma* é um parasito que está incluído no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylidea, família Ancylostomatidae (SOULSBY, 1982). Porém, estudos de filogenia molecular propõem uma nova classificação taxonômica para ilustrar a diversidade que existe no filo Nematoda que a taxonomia baseada em critérios morfológicos não mostra. De acordo com esta nova classificação, o filo Nematoda é dividido não mais em duas classes, mas em cinco grupos ou clados, no qual o *Ancylostoma* estaria incluído no clado número V (BLAXTER et al., 1999).

A família Ancylostomatidae é caracterizada por nematódeos que apresentam cápsula bucal bem desenvolvida, armada com dentes ou lâminas quitinosas cortantes em sua margem ventral. Parasitos desta família

apresentam um nítido dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de uma bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior. A maioria das espécies parasita o intestino delgado, alimentando-se do sangue de vários hospedeiros mamíferos, incluindo o homem (SOULSBY, 1982).

Dentre as subfamílias pertencentes a esta família, podemos destacar duas de interesse para a parasitologia médica e/ou veterinária: Ancylostomatinae e Bunostomatinae. Os indivíduos pertencentes à subfamília Ancylostomatinae caracterizam-se por apresentarem, na margem da cápsula bucal, um a quatro pares de dentes quitinosos. Na subfamília Bunostomatinae, além de outras características diferenciais, ocorre a substituição dos dentes por lâminas cortantes, destacando-se os gêneros *Necator*, *Bunostomum* e *Uncinaria*. Dentre as espécies de interesse em medicina humana e/ou veterinária, podemos citar os seguintes parasitos: *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859), *Ancylostoma braziliense* (FARIA, 1910), *Ancylostoma duodenale* (DUBINI, 1843), *Ancylostoma ceylanicum* (LOOS, 1911), *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800), *Necator americanus* (STILES, 1902) e *Uncinaria stenocephala* (RAILLIET, 1884). O QUADRO 1 apresenta algumas características dos principais parasitos do gênero *Ancylostoma*:

Espécie	Comprimento (mm)		Número de dentes na cavidade bucal	Hospedeiros
	Macho	Fêmea		
<i>A. caninum</i>	11 – 13	14 – 20	6 grandes	canídeos, felídeos
<i>A. duodenale</i>	8 – 11	10 – 18	4 grandes e 2 pequenos	humanos
<i>A. braziliense</i>	5 – 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos
<i>A. ceylanicum</i>	5 – 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos e humanos
<i>A. tubaeforme</i>	9,5 – 11	12 – 15	6 grandes	felídeos

(adaptado de CURY & LIMA, 2002)

QUADRO 1: Principais espécies de parasitos do gênero *Ancylostoma* com suas características morfológicas, morfométricas e hospedeiros definitivos.

1.2. Características das espécies deste trabalho

Dentre os ancilostomídeos, o *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859) é o mais disperso pelo mundo. Possui três pares de dentes na margem ventral da cápsula bucal. No fundo desta estrutura há um par de dentes triangulares dorsais e um par de dentes ventro-laterais. Além de sua importância em saúde animal, este parasito tem se destacado como agente de larva migrans principalmente em crianças (PROCIV & CROESE, 1990). Além disso a infecção provocada pelo verme adulto varia desde infecções assintomáticas a gastroenterites eosinofílicas que requerem, em alguns casos, intervenção cirúrgica, como em alguns casos já descritos na Austrália (PROCIV & CROESE, 1990). Vale lembrar que o verme não atinge a maturidade sexual em humanos (LOUKAS et al., 2000).

O *Ancylostoma braziliense* (DE FARIA, 1910) tem apenas um par de dentes bem desenvolvidos e na base de cada dente encontra-se um outro dente muito pequeno e situado medialmente. O *Ancylostoma braziliense* é o principal causador no homem da larva migrans cutânea, provocada pela penetração na pele de larvas infectantes do mesmo. Como o homem não é o hospedeiro típico, o nematódeo fica entre a derme e a epiderme e, conseqüentemente, não consegue completar seu ciclo.

O *Ancylostoma ceylanicum* (LOOSS, 1911) possui caráter zoonótico, principalmente na Ásia. Por um longo tempo foi considerado sinônimo de *A. braziliense*, porém apresenta diferenças pelas características da cápsula bucal, que possui um par de dentes ventral maior do que em *A. braziliense*, diferindo também com relação à origem e a direção dos raios da bursa (SOULSBY, 1982). Das espécies analisadas neste trabalho, é a única capaz de atingir a maturidade sexual em humanos.

1.3. Ciclo biológico

O ciclo biológico dos ancilostomídeos ainda não é totalmente elucidado. Ainda há questões a serem resolvidas principalmente com relação à migração da larva no hospedeiro. O ciclo do *A. caninum* no cão é o mais bem estudado (LOUKAS & PROCIV, 2001). Ele está descrito a seguir.

Os vermes adultos localizam-se principalmente no intestino delgado dos hospedeiros definitivos fixados à mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais. As fêmeas, após a cópula, realizam a oviposição de milhares de ovos por dia, sendo liberados para o meio exterior juntamente com as fezes dos hospedeiros. Estes ovos, encontrando condições favoráveis para o desenvolvimento, como oxigenação, umidade e temperatura adequadas, originam, num período de 24 a 48 horas, uma larva rabditóide de primeiro estágio conhecida como larva L1. Esta larva eclode do ovo e, em contato direto com o meio ambiente, alimenta-se de matéria orgânica e microrganismos para uma posterior transformação em dois estádios larvais: larva L2 (rabditóide) e larva L3 (filaríóide e infectante). A larva filarióide não se alimenta mais, entretanto, possui uma resistência muito maior que as demais formas, sendo capaz de sobreviver no ambiente por vários dias (PROCIV & CROESE, 1990).

Os canídeos podem se infectar por diversas vias: oral, percutânea, transplacentária e lactogênica. O modo de infecção por via oral ocorre da seguinte forma: ao serem ingeridas, as larvas L3 passam pelo estômago e perdem a cutícula externa pela ação do suco gástrico. Após, aproximadamente, três dias de infecção, migram para o intestino delgado e penetram nas células de Lieberkühn onde ocorre a muda para a larva L4. Posteriormente, estas voltam à luz do intestino, transformam-se em adultos jovens, fixando-se à mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais para realizar hematofagia e cópula. Após 14 a 21 dias de infecção os ovos podem ser encontrados nas fezes de seus hospedeiros (PROCIV & CROESE, 1990).

A larva infectante L3 pode infectar canídeos pelo contato e penetração via folículos pilosos e, eventualmente, atingir os capilares sangüíneos e/ou linfáticos. Essa larva recomeça a alimentação e retoma o crescimento quando é exposta ao plasma (HAWDON & SHAD, 1990). Após atingirem a circulação sangüínea são carregadas passivamente para a microcirculação pulmonar e, posteriormente, seguem uma rota conhecida como “clássica”, com migração traqueal, onde as larvas L3 penetram pelos alvéolos pulmonares, passam pelo sistema respiratório e chegam ao intestino delgado, onde ocorre a implantação dos vermes adultos. Alternativamente, estas larvas podem atingir a circulação sistêmica e se dispersarem pelos tecidos (migração somática), ficando

instaladas em fibras musculares esqueléticas como larvas L3 hipobióticas, ou seja, dormentes (CURY & LIMA, 2002).

As larvas hipobióticas podem ser reativadas para o desenvolvimento, provavelmente por estímulos endógenos e exógenos, levando à formação de vermes adultos no intestino, possivelmente quando as condições ambientais são favoráveis, como por exemplo, em períodos de maior umidade e calor (onde as condições são ótimas para a transmissão). Além disso, estas larvas podem promover infecções transplacentárias e transmamarianas as quais são influenciadas por mudanças hormonais durante o parto, assumindo uma importância epidemiológica muito elevada, sobretudo em infecções de cães com menos de seis meses de idade (KALKOFEN, 1987; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002).

Os vermes adultos ao se fixarem ao intestino podem provocar diversas patologias, destacando-se anemia, hemorragias e lesões intestinais. Estes fenômenos patológicos podem ocorrer tanto em seus hospedeiros definitivos quanto em seres humanos (PROCIV & CROESE, 1990).

Em cães, pode-se observar patologias ocasionadas por larvas L3 em decorrência da penetração, principalmente, através da pele, no pulmão e nos músculos. Dessa forma, ocorre no local da penetração uma ação traumática e irritativa, levando a um processo inflamatório. As larvas de 3º estágio, ao penetrarem na pele, produzem lesões pruriginosas. As larvas de 4º estágio, no pulmão, e os adultos, no intestino, causam pneumonite hemorrágica e lesão de mucosa, respectivamente. Podem ocorrer lesões ulcerativas da mucosa intestinal, devido a fixação dos vermes adultos neste local (CURY & LIMA, 2002). O ciclo canino nos remete ao ciclo humano, para ambos agentes etiológicos, *A. duodenale* e *N. americanus*, em vários pontos: 1) a larva de terceiro estágio é a forma infectante para o homem e a infecção se dá tanto pela penetração da larva quanto pela ingestão da mesma, 2) a larva passa por um breve período de desenvolvimento até encontrar o hospedeiro, onde reativa o processo de alimentação e desenvolvimento nos tecidos do mesmo, 3) a patologia está diretamente ligada ao número de vermes adultos na mucosa intestinal e 4) tanto a larva quanto o verme adulto liberam produtos de secreção-excreção para garantirem seu desenvolvimento no hospedeiro (HOTEZ et al., 1996).

1.4. Ocorrência e prevalência

Os ancilostomídeos de importância humana e animal possuem distribuição mundial.

O número de pessoas infectadas por ancilostomídeos em todo o mundo foi recentemente estimado em 740 milhões de casos, sendo que a mais alta prevalência ocorre na África sub-sahariana (**figura 1**). A alta transmissão ocorre também em outras áreas pobres dos trópicos, incluindo o sul da China (HOTEZ et al., 2005).

Nos últimos sessenta anos, as regiões da América Latina, Caribe e a Ásia obtiveram reduções significativas na prevalência da ancilostomose. Isso se deveu ao crescimento econômico e a melhorias nas condições sanitárias. Hoje a prevalência nestas regiões é em torno de 10%. Situação oposta é vista no continente africano onde a taxa de prevalência, de aproximadamente 30%, praticamente não se alterou nestes últimos sessenta anos (DE SILVA et al., 2003). A FIGURA 1 mostra a distribuição espacial da ancilostomíase no mundo:

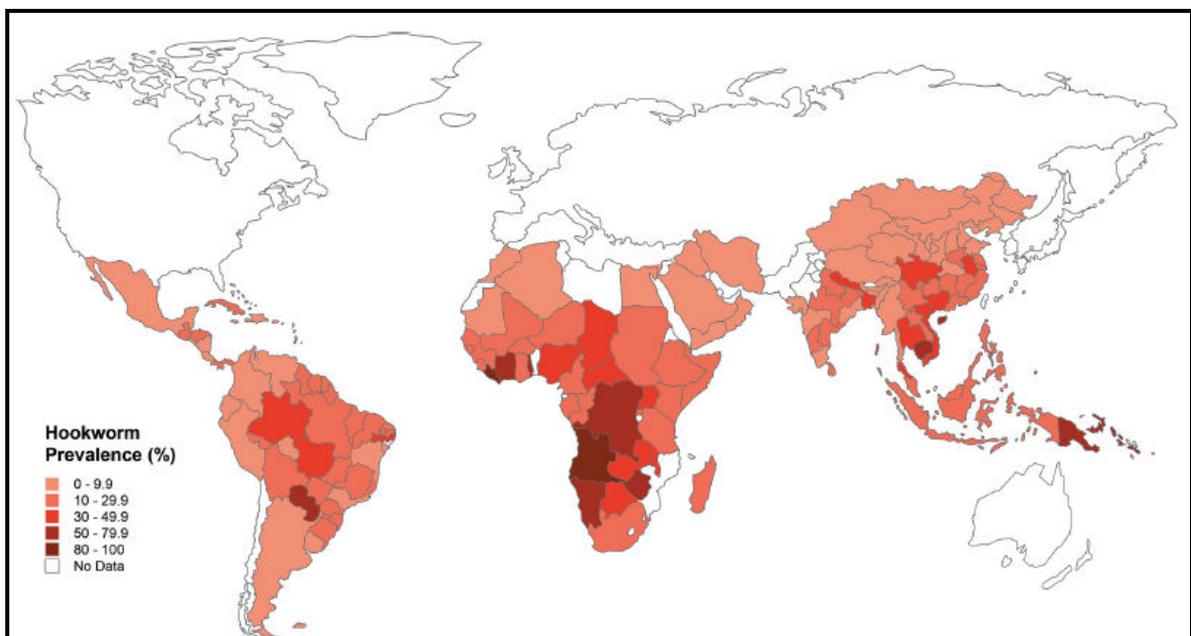


Figura 1 – Distribuição global de infecção humana por Ancilostomídeos.
(Ilustração: Margaret Shear, Public Library of Science, adaptado de Silva et. al., 2003)

Há estudos que tentam estimar a prevalência ou mesmo relatar a presença destes helmintos não somente em animais domésticos como também em animais silvestres. A prevalência em animais domésticos vem diminuindo devido ao uso indiscriminado de anti-helmínticos nos últimos quinze anos (PALMER et al., 2007). Entretanto, estudos mostram que parasitos do gênero *Ancylostoma* continuam sendo um dos nematódeos mais freqüentes em infecções intestinais de cães e gatos (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2008).

Os cães são susceptíveis às infecções com ancilostomídeos por toda a vida, entretanto, a prevalência e o nível de infecção tendem a ser mais elevados em animais mais jovens devido, principalmente, a imaturidade de seu sistema imunológico e às infecções lactogênicas (KALKOFEN, 1987).

Em um trabalho, OLIVEIRA-SEQUEIRA e colaboradores (2002) sugerem que o período sazonal e o sexo dos animais interferem na dinâmica da prevalência de *Ancylostoma* em cães, sendo mais freqüente a infecção em animais do sexo masculino durante o verão e o outono.

Outro estudo demonstrou que as espécies de ancilostomídeos, de caráter zoonótico, estão se dispersando, uma vez que foi relatado pela primeira vez a infecção natural por *A. ceylanicum* em cães na Austrália (PALMER et al., 2007). Isso representa um risco potencial para a saúde pública, já que esta espécie é a única capaz de produzir infecção patente em seres humanos.

Outro estudo na cidade de Botucatu, São Paulo, demonstrou, através de análises coprológicas, uma prevalência de 37,8% de cães parasitados por helmintos do gênero *Ancylostoma* (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2008).

1.5. Resposta imune

A complexidade do ciclo de vida dos ancilostomídeos oferece numerosas oportunidades para o parasito e o hospedeiro interagirem no nível molecular. Assim, o contato do parasito com suas barreiras críticas, como durante a invasão cutânea e passagem através dos tecidos pulmonares, bem como durante a chegada e penetração na mucosa intestinal, expõem o hospedeiro a uma diversidade antigênica muito grande (LOUKAS & PROCIV, 2001).

Além disso, cada fase de desenvolvimento do parasito expressa um perfil de proteínas antigênicas. Esses dois fatores representam um desafio para o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (LOUKAS et al., 2005).

O estudo dos mecanismos imunológicos induzidos pela infecção em modelos experimentais pode ser esclarecedor quanto à resposta humana frente à infecção por ancilostomídeos. O modelo canino se torna o mais apropriado para tais investigações se comparado a outros modelos experimentais por ser um hospedeiro natural de ancilostomídeos (FUJIWARA et al., 2006). Mesmo assim, o cão apresenta algumas limitações como o desenvolvimento de resistência à infecção (CARROLL et al., 1984).

Estudos realizados sobre a resposta imunológica de cães experimentalmente infectados por ancilostomídeos mostram que os animais adquirem resistência à infecção a medida que envelhecem (LOUKAS & PROCIV, 2001). Em geral, o animal apresenta anemia e eosinofilia. A resposta imune humoral é caracterizada por IgM, IgG total, IgG1 e IgG2. IgM aparece depois de 14-20 dias da infecção, mas começa a declinar e desaparece após oito semanas. Anticorpos IgG são detectados depois de duas semanas da infecção e os títulos se mantêm altos indefinidamente. O pico de detecção de IgG1 é de 30 dias, enquanto os níveis de IgG2 aumentam ao longo da infecção. Os níveis de IgA são mínimos e aparecem em altos títulos apenas em infecções graves (CARROLL et al., 1984 e HOTEZ et al., 2002).

A maior parte do conhecimento que se tem hoje sobre a resposta imune em humanos advém de estudos que comparam indivíduos infectados e negativos de áreas endêmicas (GEIGER et al., 2004). Em geral, a infecção é caracterizada por elevados níveis de IgE no soro e eosinofilia. Esta aparece cerca de 4 a 5 semanas após a infecção e o seu pico no sangue coincide com o início do período de patência. Quanto mais eosinófilos estiverem circulando no sangue periférico do hospedeiro, maior será a sua carga parasitária. Os eosinófilos são as células típicas encontradas nos sítios de infecção que com seus mecanismos citotóxicos conseguem eliminar parte das larvas mas não os vermes adultos (MEEUSEN et al., 2000). Nos indivíduos infectados os níveis de anticorpos específicos se mantêm altos e persistentes e estão presentes todos os isotipos, ao contrário do cão que possui baixos títulos de IgA. Os marcadores imunológicos para identificação de infecção ativa por

ancilostomídeos são os anticorpos IgE e IgG4 específicos para ES de verme adulto, uma vez que estes anticorpos sofrem maior redução após o tratamento (GEIGER et al., 2004).

Sabe-se que o perfil da resposta imune gerada é uma mistura dos perfis Th1 e Th2 com predomínio do segundo, mediado pelos efeitos das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Os níveis de IFN- γ são reduzidos e possuem associação negativa com a carga parasitária do paciente (QUINNELL et al., 2004). Já em estudos de pessoas tratadas e reinfectadas, demonstrou-se o papel protetor da IL-5 na redução da intensidade da infecção, dando mais uma evidência da contribuição da resposta Th2 na proteção (QUINNELL et al., 2004). Em indivíduos residentes em áreas endêmicas, sabe-se que ocorre uma alta produção de IL-10 que, com seu papel imunossupressor, age na regulação da patologia alterando a resposta inflamatória instalada (GEIGER et al., 2004). A imunossupressão começa a ser observada no mesmo período que o verme adulto se estabelece na mucosa intestinal. Acredita-se que o próprio verme estimule diretamente ou indiretamente, através da liberação de antígenos ES, a produção de IL-10 pelo hospedeiro.

Dentre os mecanismos efetores da resposta imune destacam-se: morte das larvas mediada por eosinófilos, produção de imunoglobulina E, degranulação de mastócitos e aumento da secreção de muco (LOUKAS & PROCIV, 2001).

Estudos mostram que a infecção por ancilostomídeos tem um efeito imunomodulatório que pode afetar a resposta imunológica do hospedeiro infectado, quando exposto aos antígenos exógenos. Nesses estudos foram evidenciados diminuição da resposta linfocitária no sangue periférico de pacientes (ONYEMELUKWE et al., 2001; KALINKOVICH et al., 1998), altos níveis de interleucina IL-10 (GEIGER et al., 2004) e imunossupressão em pacientes co-infectados por *N. americanus* e *Oesophagostomum bifurcum* (PIT et al., 2001). Entretanto, tem sido mostrado que o tratamento com anti-helmíntico pode recuperar a resposta imunológica celular do hospedeiro num período de 1 a 4 meses após o tratamento, desde que o mesmo se mantenha livre de novas infecções (GEIGER et al., 2004).

1.6. Produtos de excreção-secreção (ES)

Há diversos grupos de moléculas produzidas e secretadas por ancilostomídeos que garantem o sucesso de sua nutrição e permanência em seus hospedeiros, desencadeando respostas imunológicas nos mesmos. Esses produtos se constituem em uma complexa mistura de proteínas, carboidratos e lipídios secretados e excretados pela superfície e pelas aberturas orais dos helmintos. A maior parte da composição desta mistura é desconhecida (MULVENNA et al., 2009).

Acredita-se que os produtos de excreção/secreção (ES) de ancilostomídeos sejam responsáveis pela longa sobrevivência do parasito uma vez que interferem com a imunidade e a homeostase do hospedeiro (HOTEZ & PRITCHARD, 1995). Dentre estas moléculas se destacam: o fator inibidor de neutrófilos, proteases, anticoagulantes, lectinas tipo-c, inibidores de proteases, antioxidantes, acetilcolinesterase, proteínas de ancilostomídeos com domínios de seis-cisteínas e calcirreticulinas (LOUKAS & PROCIV, 2001).

O fator inibidor de neutrófilos (NIF) é uma glicoproteína secretada pelo verme adulto de *A. caninum*. Ela bloqueia não só a adesão de neutrófilos ativados na superfície de células endoteliais como também a liberação de peróxido de hidrogênio pelo os mesmos. Essa é uma possível explicação para o baixo número de neutrófilos nos locais onde ocorrem a alimentação do parasito (MOYLE et al., 1994).

Para garantir um sucesso nutricional o verme deve realizar dois processos: 1) inativar a cascata de coagulação sanguínea e 2) realizar a proteólise da hemoglobina. Após a ingestão de sangue pelo parasito, as hemácias são rompidas e a hemoglobina é degradada pela presença de proteases excretadas/secretadas pelo verme (WILLIAMSON et al., 2003). As proteases podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico, sendo nomeadas baseado no resíduo do centro ativo de atividade catalítica (*aspartico*, *serino* ou *cisteino* proteases) ou no tipo de cofatores necessários para sua atividade (metaloproteases).

Proteínas anticoagulantes têm-se destacado como alvo de interesse de diversos pesquisadores, tanto por constituírem em alvos para a criação de vacinas contra ancilostomídeos, bem como para o desenvolvimento de terapias

antitrombônicas em medicina humana e veterinária (LOUKAS & PROCIV, 2001).

Através de técnicas de clonagem molecular, foi descrita uma família de pequenos peptídeos secretados por vermes adultos, conhecidos como AcAPs (*A. caninum anticoagulant protein*). Um potente inibidor do fator Xa da coagulação, chamado *Ancylostoma caninum* peptídeo anticoagulante 5 (AcAP5), foi uma das primeiras proteínas secretadas a ser purificada e clonada de ancilostomídeos de cães. Foi confirmado por técnicas imunohistoquímicas que a AcAP5 localiza-se nas glândulas cefálicas em *A. caninum* (HARRISSON et al., 2001).

O grupo de moléculas conhecidas como cisteíno proteases são abundantes em nematódeos e foram detectadas em produtos de excreção/secreção (ES) em vermes adultos de *A. caninum*. Foi sugerido que uma cisteíno protease, a catepsina B, possa estar envolvida com a patogênese de enterites eosinofílicas no trato digestivo de seres humanos (HARROP et al., 1995).

Com relação às cisteíno proteases (tipo catepsina B), alguns genes foram clonados a partir de mRNA de vermes adultos de *A. caninum*, destacando-se a Ac-CP-2 que é expressa no intestino de ancilostomídeos e está envolvida em processos hemoglobinolíticos (experimentos *in vitro*) (WILLIAMSON et. al, 2003). Outra cisteíno protease de *A. caninum*, Ac68, foi purificada e utilizada para fins diagnósticos imunológicos de indivíduos portadores de infecção causada por este helminto (LOUKAS, et al., 2000).

Vários cDNA codificando aspártico proteases tem sido identificados em nematódeos, incluindo a enzima tipo catepsina D de ancilostomídeos de cão e homem, respectivamente, Ac-APR-1 e Na-APR-1. Essas proteases são expressas no intestino (microvilosidades) e em glândulas amphidiais. Elas clivam a hemoglobina em numerosos sítios distintos (WILLIAMSON et. al, 2002).

As metaloproteases podem ser endoproteases ou exopeptidases, sendo a sua atividade encontrada em produtos ES de *A. caninum*. A proteína MEP-1 de *A. caninum* foi clonada e caracterizada. A Ac-MEP-1 é uma enzima dependente de zinco e é expressa no lúmen intestinal de ancilostomídeos (vermes adultos). Estudos sugerem que Ac-MEP-1 está envolvida na digestão

de hemoglobina, porém isto não ocorre quando a hemoglobina está intacta, somente quando esta sofre uma prévia digestão parcial por Ac-APR-1 e Ac-CP-2 (WILLIAMSON et al., 2004). Metaloproteases, encontradas em produtos ES de verme adulto de *Necator americanus*, são importantes no processo de modulação da resposta imune, pois clivam a quimiocina eotaxina, substância responsável pelo recrutamento de eosinófilos para o sítio de inflamação (CULLEY et al., 2000).

Um outro grupo de moléculas encontrados nos produtos ES de ancilostomídeos são os inibidores de proteases. Um inibidor de serino protease foi descrito em ES de verme adulto de *A. ceylanicum* (Kunitz inhibitor 1) como um potente inibidor de enzimas pancreáticas envolvidas no processo digestório do hospedeiro como a tripsina, a quimotripsina e a elastase (MILSTONE et al., 2000).

Enzimas com papel antioxidante também foram descritas em antígenos ES de *N. americanus*. Estas enzimas provavelmente protegem a superfície exposta da cutícula do verme da ação oxidativa dos radicais livres gerados pelos leucócitos do hospedeiro (TAIWO et al., 1999).

Produtos de excreção/secreção (ES) larvais também têm sido foco de interesse de vários pesquisadores, principalmente após a descoberta da família protéica ASP (*Ancylostoma secreted-protein*). Dentre os membros desta família se destaca uma proteína rica em resíduos de cisteína, a ASP-1. Ela possui peso molecular de 42kDa e é secretada antes mesmo da larva infectante retomar sua alimentação. Acredita-se que seu efeito imunomodulatório reside em sua toxicidade sobre células efectoras do sistema imune, uma vez que essa proteína possui alta homologia com proteínas de insetos venenosos (HAWDON et al., 1996).

Outra proteína, desta mesma família, que merece destaque é a ASP-2, considerada como um dos principais candidatos a vacina para seres humanos. A ASP-2 é liberada pela larva depois de invadir o hospedeiro e acredita-se que tenha importante papel na transição do modo de vida livre para o de vida parasitária. Apesar de não encontrar nenhuma atividade de protease, estudos recentes mostram que a ASP-2 de *Necator americanus* possui similaridades de estrutura e carga com quimiocinas (ASOJO et al., 2005) e que foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos e monócitos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Este recrutamento, principalmente de neutrófilos, seria importante para causar o aumento da permeabilidade tissular o que levaria ao favorecimento da migração da larva pelo hospedeiro (BOWER et al., 2008).

Atividades de proteases do subtipo metaloproteases também já foram identificadas em produtos ES de larvas infectivas de *A. caninum* e *A. duodenale*. Estas metaloproteases foram capazes de degradar a fibronectina humana, componente da matriz extracelular do tecido conectivo da pele, o que seria fundamental para a invasão da larva no hospedeiro (HOTEZ et al., 1990).

1.7. Geração de vacinas

A comprovação de rápidas reinfecções após o tratamento, a diminuição da eficácia após o uso repetitivo e o aumento da resistência às drogas anti-helmínticas, faz com que o desenvolvimento de vacinas contra ancilostomídeos se torne ainda mais importante. É com este intuito que surge a Human Hookworm Vaccine Initiative (HHVI), uma parceria entre várias instituições de diferentes países para tornar esta vacina disponível no mercado. Esta iniciativa é liderada pela Sabin Vaccine Institute.

Uma vacina ideal para combater a ancilostomose seria aquela capaz de bloquear a penetração e a migração do estágio larval nos tecidos ou aquela capaz de interromper a alimentação do estágio adulto, ou até mesmo as duas coisas (LOUKAS et al., 2006).

Até o momento, têm sido focadas duas abordagens principais de imunização contra ancilostomídeos: I) Imunização por larvas (L₃) irradiadas e II) Imunização por proteínas recombinantes de excreção/secreção de larvas e parasitos adultos: “*Ancylostoma* secreted protein” ASP-1 e ASP-2; “Astacin-like metalloprotease” MTP-1; “aspartic protease” APR-1 (LOUKAS et al., 2005).

É importante ressaltar que, até hoje, nenhum ensaio de imunização foi capaz de induzir imunidade esterelizante. O que se tem visto é a redução da carga parasitária e diminuição do tamanho, da fecundidade e da longevidade dos helmintos adultos, o que resulta em redução significativa da perda de sangue (anemia) e de ovos liberados nas fezes dos hospedeiros (diminuição da transmissão) (LOUKAS et al., 2006).

Já os ensaios *in vitro* demonstraram que os anticorpos produzidos pelo estímulo vacinal reduzem a capacidade da larva de penetrar nos tecidos do hospedeiro. Larvas incubadas com soro de cães vacinados com larvas irradiadas apresentaram queda de 60% na migração tecidual (FUJIWARA et al., 2006). E larvas incubadas com soro de cães vacinados com o antígeno de *A. caninum* Ac-16 apresentaram redução de 65% (FUJIWARA et al., 2007).

Os dados obtidos em diversos estudos levam a crer que a resposta imune instalada devido à vacina resulte em uma atenuação das larvas causando um prejuízo tanto na sua capacidade de penetração/migração quanto no seu desenvolvimento sexual. Porém, o mecanismo exato de como se dá a proteção vacinal ainda é desconhecido. Sabe-se que são processos mediados por anticorpos e que há uma memória imunológica que se comprova pela proliferação linfocitária observada nos animais vacinados.

Cães imunizados com larvas irradiadas apresentaram redução de aproximadamente 90% da carga parasitária quando submetidos à infecção (MILLER, 1965). Outro trabalho apresentou uma redução de 87% nos ovos liberados nas fezes e redução de 53% no número de vermes adultos recuperados de cães imunizados se comparados com os cães do grupo controle (FUJIWARA et al., 2006). A resposta imune humoral é caracterizada pela alta produção de anticorpos IgG1 e pela moderada de IgG2 contra o antígeno larval ASP-2. Ocorre proliferação de linfócitos apenas nos órgãos linfóides próximos aos sítios de infecção. Além disso, a produção de citocina IL-4 predomina sobre interferon-gama (IFN- γ) e IL-10, sugerindo uma resposta Th2 localizada. Ocorre também um aumento significativo de células como eosinófilos, linfócitos B e de linfócitos expressando o MHC classe 2 (FUJIWARA et al., 2006).

Hamsters e cães imunizados com ES de larva (ASP-2) apresentaram proteção parcial (redução da carga parasitária e de ovos liberados nas fezes) quando desafiados em uma infecção com *A. ceylanicum* (GOUD et al., 2004) e *A. caninum* (MENDEZ et al., 2005) respectivamente.

A resposta imunológica obtida na vacinação de cães com larvas irradiadas e com antígenos de excreção/secreção são semelhantes, já que em ambos os casos os animais vacinados apresentaram altos níveis de anticorpos para ASP-2 (FUJIWARA et al., 2005).

Um estudo imunoepidemiológico demonstrou uma associação positiva entre os níveis de anticorpos IgE anti-ASP-2 e o risco reduzido de desenvolver infecção grave por ancilostomídeo em áreas endêmicas da China e do Brasil (BETHONY et al., 2005).

Por estes achados é que o antígeno ASP-2 de *Necator americanus* foi selecionado como candidato à vacina para controle da infecção humana por ancilostomídeo. Esta vacina já foi testada em fase I de teste clínico (BETHONY et al., 2008).

Cães imunizados com ES de verme adulto (cisteíno protease Ac-CP-2) apresentaram vermes adultos menores que aqueles recuperados dos cães do grupo controle além de liberar menor quantidade de ovos nas fezes (redução da fecundidade) (LOUKAS et al., 2004).

Vacinação de cães com a recombinante Ac-APR-1 induziu resposta celular e humoral, reduzindo significativamente a carga parasitária e a quantidade de ovos produzidos por *A. caninum* em cães desafiados. Além disso, os cães vacinados não desenvolveram anemia. Anticorpos IgG dos cães vacinados diminuíram a atividade catalítica da Ac-APR-1 *in vitro*. Estes mesmos anticorpos também foram encontrados aderidos à mucosa intestinal do verme adulto. Estes achados levam a crer que esta vacina realmente interfere com o processo digestório do parasito (LOUKAS et. al, 2005).

Uma vez que ensaios de imunizações com os ES de larva e de adulto isolados produziram bons resultados, a tendência é criar uma vacina que reúna um antígeno específico de cada fase do helminto (vacina bivalente) ou uma vacina que contenha um ES que seja expresso tanto na fase de larva quanto na de adulto (vacina monovalente) (LOUKAS et. al, 2006).

Um trabalho recente apresentou um possível candidato à produção de uma vacina monovalente: o antígeno de *A. caninum* Ac-16, que é expresso na cutícula do verme tanto na fase larval quanto na de adulto. A proteção induzida em cães foi evidenciada pela redução de 63% na produção de ovos pelas fêmeas e pela diminuição da perda de sangue pelo hospedeiro se comparado ao grupo controle. A resposta vacinal é caracterizada por altos títulos de IgG1, IgG2 e IgE. Ocorre a proliferação de linfócitos específicos assim como uma produção significativa de IFN- γ . A partir deste último dado podemos concluir

que o padrão Th1 também exerce seu papel na imunidade conferida pela vacinação (FUJIWARA et al., 2007).

É esperado que com o uso de uma vacina em larga escala prolongue-se o intervalo requerido entre os tratamentos anti-helmínticos periódicos e leve também a um atraso no surgimento de resistência às drogas hoje disponíveis, além de prevenir o quadro de doença (redução da morbidade).

1.8. Proteômica

A proteômica é uma abordagem funcional do genoma de um organismo vivo, ou seja, propõe-se a analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas por uma célula até mesmo por um organismo inteiro num dado momento, condição ou estágio de vida. Ao conjunto de proteínas produzidas dá-se o nome de proteoma. Além de dizer quais proteínas são expressas, esta análise permite avaliar os níveis de expressão e o momento em que essas proteínas são produzidas (MULVENNA et al., 2009).

A caracterização de proteomas tem sido feita graças aos avanços obtidos para duas tecnologias: a eletroforese em gel em duas dimensões e a espectrometria de massa (ASHTON et al., 2001).

A eletroforese em duas dimensões consiste em duas etapas. A primeira etapa da separação, denominada primeira dimensão, consiste em uma focalização isoeletrica, procedimento usado para determinar o ponto isoeletrico (pI) de uma proteína. As proteínas, sob influencia de um campo elétrico, percorrem um gel ou uma fita de papel onde há um gradiente de pH. Elas migram e estacionam no pH correspondente ao seu pI, onde sua carga líquida é zero. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas por eletroforese convencional (SDS-PAGE) de acordo com seu peso molecular. Ao final obtém-se um perfil bidimensional de pontos no gel ou "spots", cada um contendo moléculas de uma proteína específica (MORPHEW et al., 2007).

Combinando estes dois métodos de separação, consegue-se a resolução de misturas complexas de proteínas. Este método composto é mais sensível do que a focalização isoeletrica ou a eletroforese em SDS sozinhos. A eletroforese bidimensional, portanto, separa as proteínas de peso molecular

idêntico, que diferem em seu ponto isoelétrico, ou proteínas com pI similar, porém de pesos moleculares diferentes.

Até recentemente, as proteínas eram identificadas apenas por sua seqüência primária de aminoácidos ou por suas propriedades antigênicas. Hoje os métodos de escolha baseiam-se na espectrometria de massa, que determinam de forma acurada a massa molecular (ASHTON et al., 2001).

Basicamente, as proteínas sofrem a digestão por uma protease, como a tripsina, e são transformadas em uma mistura de peptídeos. Estes, por sua vez, são ionizados, em seguida, acelerados por um campo elétrico a vácuo e, posteriormente, analisados por um detector que utiliza como um dos parâmetros o tempo de voo dos peptídeos no espectrômetro. Ao final do processo, obtêm-se a razão massa/carga das moléculas.

A identificação dos peptídeos processados se dá através do acesso ao banco de dados de seqüências gênicas por diferentes ferramentas de bioinformática.

A espectrometria de massa permite de forma sensível, acurada e rápida a identificação de proteínas. Além disso, é menos trabalhosa que as outras técnicas de identificação de proteínas como por produção de anticorpo ou por *screening* de bibliotecas de clones.

Tentativas anteriores de identificação de proteínas, como os produtos ES, baseavam-se na análise individual de proteínas ou de pequenas famílias protéicas, geralmente tendo como ponto de partida uma seqüência gênica seguida da produção e caracterização do antígeno recombinante (ZHAN et al., 2003).

Estudos de análise proteômica para ancilostomídeos são praticamente inexistentes, ao contrário do que já ocorre para outros helmintos de importância parasitológica como *Fasciola* spp. (MORPHEW et al., 2007); *Ascaris* spp. (ISLAM et al., 2004); *Trichinella* spp. (ROBINSON et al., 2007); *Haemonchus contortus* (YATSUDA et al. 2003); *Brugia malayi* (HEWITSON et al., 2008); *Schistosoma mansoni* (KNUDSEN et al. 2005) e também para vermes de vida livre como *Caenorhabditis elegans* (TABUSE et al., 2005).

Assim como nos ensaios de imunização, as proteínas de interesse para a análise proteômica são aquelas envolvidas na interface parasito-hospedeiro

que modificam o ambiente modulando a resposta imune do segundo para garantir o desenvolvimento e sobrevivência do primeiro.

Estudos de proteômica têm sido realizados com diferentes objetivos tais como: 1) verificar mudanças no padrão de expressão de proteínas ES e totais (para *Ascaris suum*) quando o parasito é submetido a diferentes ambientes (aeróbico e anaeróbico) na tentativa de compreender melhor as modificações que ocorrem no parasito durante seu ciclo de vida (ISLAM et al., 2004); 2) analisar de forma comparativa o proteoma de antígenos ES de diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero (*Trichinella*) que parasitam o mesmo hospedeiro, porém se comportam de forma oposta, com o intuito de explicar tais diferenças biológicas (ROBINSON et al., 2007); 3) acompanhar as alterações nos perfis de expressão protéica do verme durante as diferentes fases de seu ciclo de vida (TABUSE et al., 2005) e 4) comparar a proteômica de antígenos ES do parasito (*Fasciola*) quando liberados *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de analisar quais são os constituintes majoritários e se há mudanças no padrão de expressão sob as duas situações propostas (MORPHEW et al., 2007).

Para os ancilostomídeos, há o trabalho de MULVENNA e colaboradores (2009) que avaliou o conteúdo dos produtos ES para a fase adulta do *Ancylostoma caninum*. Neste estudo foram identificadas 105 proteínas, sendo, na sua maioria, lectinas e proteases pertencentes às três maiores classes encontradas em nematódeos: aspártico, cisteíno e metaloproteases.

Todos estes trabalhos demonstraram o valor da proteômica como ferramenta para a identificação de proteínas que são diferencialmente expressas quando analisadas sob circunstâncias diferentes e quais delas são imunogênicas.

Estas proteínas-chave podem ser a explicação para os aspectos envolvidos na complexa interação parasito-hospedeiro e, também, possíveis alvos para novas quimioterapias e para o desenvolvimento de vacinas.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de sua importância global e da cronicidade das infecções por ancilostomídeos, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos de interação parasito-hospedeiro, principalmente em relação aos aspectos imunológicos humorais e celulares frente aos vermes adultos e às formas larvais. Não se sabe ao certo se a resposta imunológica instalada exerce qualquer efeito significativo em termos de proteção ao hospedeiro ou de sobrevivência do parasito.

Mesmo com essas lacunas sobre o entendimento da resposta imune contra ancilostomídeos, os estudos moleculares com antígenos do parasito para o desenvolvimento de vacinas tem avançado a cada dia. Entretanto, não há descrito na literatura nenhum estudo que se proponha a analisar de forma comparativa o proteoma do parasito e a resposta do hospedeiro frente aos antígenos das diferentes espécies de ancilostomídeos em seus diferentes estágios de vida (larva e verme adulto).

Para outras parasitoses, como é o caso do nematódeo *Gnathostoma binucleatum*, estudos com objetivos semelhantes resultaram em melhoria no diagnóstico, alencando antígenos que tornaram o método espécie-específico (CABALLERO-GARCÍA et al., 2007). Além disso, a análise proteômica de antígenos secretados-excretados resultou em novas perspectivas para elucidar diferenças biológicas na interação parasito-hospedeiro de duas espécies do gênero *Trichinella* (ROBINSON et al., 2007).

Nesse trabalho nos propomos a analisar, de forma comparativa, diferentes aspectos da relação parasito-hospedeiro, como o perfil protéico dos produtos excretados e secretados (ES) das diferentes espécies de ancilostomídeos. Há mais de vinte anos que estudos com esta proposta não são publicados na literatura.

Os resultados dessas análises poderão ajudar a elucidar, por exemplo, o porquê de uma das espécies que parasita cães, o *Ancylostoma ceylanicum*, ser também capaz de infectar e fechar o ciclo de vida em humanos, enquanto as demais espécies de cães não o fazem.

As conclusões deste estudo poderão contribuir para uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos na interação parasito-hospedeiro com reflexos futuros no controle desta parasitose de importância mundial tanto em medicina humana quanto animal.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar um estudo comparando aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares da infecção canina por três espécies de ancilostomídeos: *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense*.

3.2. Específicos

- Estabelecer infecções para *A. braziliense* e *A. ceylanicum* em cães no canil do Departamento de Parasitologia da UFMG;
- Comparar o curso da infecção canina para as três espécies de ancilostomídeos através de parâmetros parasitológicos (eliminação de ovos nas fezes e recuperação de vermes adultos) e parâmetros clínicos (contagem de hemácias e leucócitos circulantes);
- Comparar o perfil protéico dos produtos excretados e secretados e de antígeno total de verme adulto e de larva L₃ das três espécies de *Ancylostoma*;
- Identificar, através da espectrometria de massa, proteínas de interesse selecionadas a partir dos perfis protéicos;
- Comparar a resposta imune humoral dos hospedeiros durante a fase aguda da infecção frente a antígenos totais e de excreção-secreção tanto de larvas L₃ quanto de vermes adultos das espécies *A. caninum*, *A. braziliense* e *A. ceylanicum*.
- Analisar o perfil imunogênico obtido para as diferentes espécies de parasitos através de reações cruzadas entre soros de animais com infecção específica frente a antígenos ES e total de larvas de terceiro estágio e de vermes adultos de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*;

MATERIAL E MÉTODOS

4. METODOLOGIA

Todos os procedimentos aqui relatados visaram minimizar o sofrimento dos animais seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado sob o número de protocolo: 65/2008.

4.1. Obtenção das cepas de *Ancylostoma*

Para *A. braziliense*, a cepa foi isolada primeiramente de um cão proveniente do Centro de Controle de Zoonoses da prefeitura municipal de Belo Horizonte, infectado com mais de uma espécie de *Ancylostoma*. As fêmeas de *A. braziliense* (n=20) obtidas foram maceradas e dos ovos retirados foram feitas coproculturas e as larvas resultantes (n=450 L3/animal) foram inoculadas via oral em dois gatos. Depois as larvas obtidas dos gatos passaram por um cão e deste foram obtidas as larvas infectantes para o grupo experimental (MILLER, 1966).

Para *A. ceylanicum*, larvas proveniente de hamsters infectados foram inoculadas via oral em um cão. Posteriormente, as larvas deste foram utilizadas na infecção do grupo. A cepa originária era proveniente da George Washington University.

Para *A. caninum*, as larvas infectantes do grupo experimental foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Helminologia Veterinária do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A cepa originária era proveniente da George Washington University.

4.2. Manutenção das cepas de *Ancylostoma*

Para manutenção das três cepas de *Ancylostoma* utilizadas neste trabalho foram utilizados cães (*Canis familiaris*) de ambos os sexos, com aproximadamente dois meses de idade e sem raça definida. Todos os animais foram obtidos através de doação e passaram por vermifugação prévia (Printel 3mL/cão, via oral, dose única – Centagro).

Outros modelos experimentais, como camundongos e ratos, não são considerados adequados uma vez que, nestes hospedeiros, os vermes não atingem a fase adulta, sendo classificados como modelos não fisiológicos (XIAO et al., 1998).

Os animais foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em celas metálicas individuais, num total de oito animais por grupo experimental, totalizando vinte e quatro animais. Foram oferecidas água e ração comercial diariamente. A limpeza das celas foi feita duas vezes por semana.

4.3. Infecção dos grupos experimentais

Para infecção, 100 larvas de terceiro estágio (L₃) por quilo de animal foram inoculadas, via oral, por animal, com a respectiva espécie de *Ancylostoma* do grupo experimental ao qual o cão pertencia. Cada grupo experimental foi infectado em um tempo diferente para evitar a manutenção concomitante de cepas infectantes para o hospedeiro. As tabelas 1, 2 e 3 a seguir mostram a quantidade de larvas L₃ que cada animal ingeriu de acordo com seu peso:

TABELA 1: Infecção do grupo *Ancylostoma braziliense* segundo o peso por animal

Cão	Peso (Kg)	Volume ingerido (µL)	Quantidade L3 ingerida
1	2,9	186	290
2	2,8	180	280
3	2,8	180	280
4	3,2	205	320
5	3	193	300
6	2,9	186	290
7	2,1	135	210
8	3,6	230	360
Média	2,91 (± 0,42)	186,88 (± 26,8)	291,25 (± 42,2)

A concentração de larvas na solução era de 156 L₃/100µL.

TABELA 2: Infecção do grupo *Ancylostoma caninum* segundo o peso por animal

Cão	Peso (Kg)	Volume ingerido (μL)	Quantidade L3 ingerida
1	1,4	156	140
2	1,2	133	120
3	1,5	167	150
4	1,6	172	160
5	1,2	133	120
6	1,25	139	125
7	1,1	122	110
8	1,2	133	120
Média	1,31 (\pm 0,17)	144,38 (\pm 18,2)	130,63 (\pm 17,4)

A concentração de larvas na solução era de 90 L3/100 μL .

TABELA 3: Infecção do grupo *Ancylostoma ceylanicum* segundo o peso por animal

Cão	Peso (Kg)	Volume ingerido (μL)	Quantidade L3 ingerida
1	2,75	1100	275
2	2,75	1100	275
3	2,3	920	230
4	3	1200	300
5	3,2	1300	320
6	3,4	1400	340
7	1,7	700	170
8	2,1	850	210
Média	2,65 (\pm 0,58)	1071,25 (\pm 235,5)	265,00 (\pm 57,8)

A concentração de larvas na solução era de 25 L3/100 μL .

4.4. Coleta de sangue

As coletas de sangue para obtenção de soro ocorreram nos dias 0, 7, 14 (período de início de patência) após a infecção (DAI) e no dia da necrópsia dos animais. O sangue coletado foi centrifugado e o soro obtido foi aliquoteado e estocado em freezer a -20°C até a sua utilização nos testes imunológicos.

Além da coleta para a realização dos testes imunológicos, o sangue foi também coletado para a realização dos exames hematológicos como a contagem global de leucócitos e de hemácias. Para isto utilizou-se tubo contendo anticoagulante EDTA (BioClin).

4.5. Contagem de hemácias

As coletas de sangue para contagem de hemácias ocorreram nos dias 0, 7 e 21 após a infecção (DAI). A contagem foi feita pelo método da câmara de Neubauer. Fez-se uma mistura de 4mL do líquido diluidor (PBS) com 20 μL de sangue, diluição final 1:200. Após agitação, os retículos da câmara foram preenchidos e ficaram em repouso por 5 minutos. Após sedimentação dos glóbulos, procedeu-se a contagem dos retículos no microscópio e ao valor encontrado multiplicou-se pelo fator de conversão (10.000).

4.6 Contagem global de leucócitos

As coletas de sangue para contagem de leucócitos ocorreram nos dias 0, 7 e 21 após a infecção (DAI). A contagem foi feita pelo método da câmara de Neubauer. Fez-se uma mistura de 400 μL do líquido diluidor (líquido de Turck) com 20 μL de sangue, diluição final 1:20. Após agitação, os retículos da câmara foram preenchidos e ficaram em repouso por 5 minutos. Após sedimentação dos glóbulos, procedeu-se a contagem dos retículos no microscópio e ao valor encontrado multiplicou-se pelo fator de conversão (50).

4.7. OPG

Sete dias após a infecção, foi iniciada a coleta de fezes dos animais infectados, três vezes por semana, para realização do exame de fezes, que consistiu na contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), segundo a técnica de McMaster (COLES et al., 1992).

Para isso, das fezes coletadas foram retirados dois gramas, que foram homogeneizadas em 30mL de água. A essa solução foi acrescentado mais 30mL de solução salina saturada. Após agitação vigorosa, a câmara foi preenchida e levada ao microscópio óptico para observação e contagem dos ovos. À soma das contagens multiplicou-se pelo fator 200 para obter o valor de OPG final.

4.8. Coprocultura / Baermann

Além da contagem de OPG, as fezes foram utilizadas para a coprocultura. Às fezes, foi acrescentado um pouco de água para homogeneização do material, adicionando-se, em seguida, vermiculita de granulação 1 para aeração do meio. Essa coprocultura foi incubada a 27°C por sete dias, quando foi então feito o exame de Baermann Moraes modificado (BARÇANTE et al., 2003) para recuperação das larvas infectantes L₃, após, no mínimo, 12 horas.

4.9. Preparação das larvas

As L₃ recuperadas foram lavadas em solução salina tamponada (PBS pH 7,4) e centrifugadas (200g – 5 minutos – 25°C). Este procedimento foi repetido três vezes e, posteriormente, as L₃ foram contadas por estimativa em microscópio estereoscópio. As larvas recuperadas foram tratadas com HCl 0,1% por 10 minutos sob agitação (axenização). Ao término, a solução foi novamente lavada em solução salina e armazenada ao abrigo de luz até a sua utilização.

4.10. Obtenção dos vermes adultos

Os vermes adultos de *Ancylostoma* foram obtidos após necropsia dos cães. Por motivos operacionais, que não fizeram parte do desenho experimental, o tempo de sacrifício dos três grupos experimentais foi diferente: 54 DAI para o grupo de *A. braziliense*, 63 DAI para o grupo de *A. caninum* e de 39 DAI para o grupo de *A. ceylanicum*.

O método de escolha para a eutanásia dos animais foi o de sobredose de anestésico geral (Tiopental Sódico 2,5%) via endovenosa. Este procedimento está de acordo com a resolução número 714 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Após o sacrifício, os animais foram colocados em decúbito dorsal e tiveram a cavidade abdominal aberta. Os intestinos delgados foram retirados e tiveram a mucosa raspada e lavada para desprendimento dos vermes adultos fixados.

Em seguida, ocorreu a filtração do conteúdo intestinal em tamis de 0,25mm. O material filtrado foi transferido para um recipiente transparente, sob jato de água, para separação dos vermes adultos machos e fêmeas e posterior contagem e identificação, utilizando um microscópio estereoscópico.

4.11. Obtenção de produtos ES de larvas

A partir da obtenção das larvas L3 axênicas, essas foram adicionadas em placas estéreis contendo meio de cultura RPMI 1640 numa taxa de 100.000 larvas por mililitro de meio. À essa cultura foi acrescentado 6% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, EUA). Toda esta etapa foi realizada em capela de fluxo laminar.

A cultura foi incubada em estufa por, no mínimo, 18 horas a 37°C e 5% de gás carbônico. Ao final da incubação, o meio de cultura foi coletado e centrifugado (14.000g por 3 minutos) e o sobrenadante contendo os antígenos ES foi armazenado a -20°C. O sedimento contendo as larvas também foi guardado para posterior produção de antígeno total.

Para concentrar os antígenos produzidos, adicionou-se o meio de cultura em tubo contendo filtro de limite de 10kDa (Millipore 10.000 MWCO) seguido

de centrifugação (6000g / 10 minutos / 4°C). O volume concentrado era colocado em tubo eppendorf. Foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Promega) para conservação das amostras.

4.12. Obtenção de produtos ES de vermes adultos

O protocolo de obtenção de antígenos ES de verme adulto foi realizado de forma semelhante ao já descrito para obtenção de produtos ES de larvas. Basicamente, vermes adultos coletados após necropsia foram previamente lavados em PBS e adicionados em tubos Falcon contendo o meio RPMI 1640 suplementado com 6% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, EUA), numa taxa de 15 vermes por mililitro de meio. Toda esta etapa foi realizada em capela de fluxo laminar.

A cultura foi incubada em estufa por, no mínimo, 18 horas a 37°C e 5% de gás carbônico. Ao final da incubação, o meio de cultura foi coletado e centrifugado (14.000g por 3 minutos) e o sobrenadante contendo os antígenos ES armazenado a -20°C. Os vermes adultos também foram guardados para posterior produção de antígeno total.

Para concentrar os antígenos produzidos, adicionou-se o meio de cultura em tubo contendo filtro de limite de 10kDa (Millipore 10.000 MWCO) seguido de centrifugação (6000g / 10 minutos / 4°C). O volume concentrado era colocado em tubo eppendorf. Foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Promega) para conservação das amostras.

4.13. Produção de extrato total (larva e verme adulto)

As larvas e vermes adultos remanescentes do cultivo de produtos ES foram utilizados na obtenção dos extratos totais.

A produção de extrato total a partir de larvas L₃ foi feita a partir do rompimento das larvas por sonicação em banho de gelo. Foram feitos 40 ciclos de 30 segundos cada com intervalo de 1 minuto entre eles (Ultrasonic Homogenizer – 4710 Series – Modelo CP50). O material foi centrifugado (6.000 rpm / 15 minutos / 4°C). O sobrenadante, contendo os antígenos, foi dosado

posteriormente. Foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Promega) para conservação das amostras.

A produção de extrato total a partir de vermes adultos foi feita pela maceração mecânica dos parasitos (rompimento de cutícula e membranas) através do macerador de tecidos (Tissue Grinder, Fisher Scientific, EUA) seguido da separação de debris por centrifugação (14.000 rpm / 10 minutos / 4°C). Foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Promega) para conservação das amostras.

4.14. Dosagem dos antígenos produzidos

Os antígenos produzidos nas etapas descritas anteriormente foram dosados para determinar a concentração de proteínas. As proteínas foram dosadas pelo uso de kit comercial (Pierce BCA kit, Pierce, USA) seguindo as instruções do fabricante. A proteína albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

4.15. Obtenção dos perfis protéicos

Para a obtenção dos perfis protéicos de produtos ES e de extratos totais das larvas e vermes adultos foi utilizada a técnica de eletroforese SDS-PAGE.

Vinte microgramas de cada extrato foram misturados em tampão de amostra 5X e fervidos por 5 minutos a 95°C. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida a 12% em uma voltagem de 70V durante a resolução no gel de concentração (*stacking gel*) e de 130V no restante da corrida, em tampão tris-glicina 1X (25mM Tris base, 200mM Glicina, 3mM SDS).

Os géis foram corados por Coomassie brillante blue R250 (Amersham Biosciences) e por nitrato de prata. Resumidamente a coloração por Coomassie se deu pela imersão do gel em três diferentes soluções fixadoras (Fixadora 1: ácido ortofosfórico 2%, etanol 30%; Fixadora 2: ácido ortofosfórico 2%; Fixadora 3: ácido ortofosfórico 2%, etanol 18%, sulfato de amônio 12%). Ao final, acrescentou-se 500µL da solução de Coomassie 2% (p/v) na última solução fixadora e o gel ficou imerso nesta solução até a visualização adequada das bandas. Já na coloração pelo nitrato de prata, o gel ficou imerso

em solução fixadora (50% metanol, 12% ácido acético) por 30 minutos; lavado três vezes, 20 minutos cada, com solução de 50% de etanol; imerso em solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto; lavado com água destilada; imerso em solução de nitrato de prata 0,2% por 20 minutos; lavado novamente em água destilada e imerso em solução reveladora (carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05%) até a visualização das bandas. A reação foi interrompida com água destilada e o gel foi estocado em solução de metanol 50%.

Para estimar o peso molecular de determinadas bandas utilizou-se o método de regressão linear construído a partir dos dados referentes à migração das bandas do padrão de peso molecular.

4.16. Testes imunológicos

4.16.1. “Enzyme lynked immunossorbent assay” – ELISA

Na técnica de ELISA, placas de poliestireno foram sensibilizadas com proteínas do parasito e os soros a serem testados foram adicionados às placas para a formação de complexos imunes. As ligações antígeno-anticorpo foram revelados por uma solução contendo uma anti-imunoglobulina conjugada a uma enzima capaz de produzir reação colorida quando se adiciona o substrato adequado.

Resumidamente, 100µL dos diferentes antígenos, na concentração de 5µg/mL, diluídos em tampão carbonato (0,05 M NaHCO₃ pH 9,6) foram aderidos às placas (BD Falcon) por aproximadamente 16 h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (0,15 M PBS; Tween 0,05%). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com 250µL por poço da solução de bloqueio (PBST20 0,5%; 2% leite desnatado em pó) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, 100µL dos soros a serem testados, em duplicata, foram adicionados diluídos seriadamente (1:100 até 1:121.500) em PBST20 e a placa incubada por aproximadamente 16 h a 4°C. As placas foram subsequentemente lavadas por cinco vezes em tampão de lavagem. A seguir, 100µL do anticorpo secundário (IgG) conjugado à enzima peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., USA) diluído na proporção de 1:10000 em PBST20 foram adicionados às placas por 1 hora e 30 minutos à temperatura

ambiente. Após cinco lavagens, 100µL da solução contendo o substrato enzimático peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e cromógeno (O-Phenylenediamine – Sigma-Aldrich Co., USA) foram adicionados às placas e as mesmas foram incubadas no escuro a 37°C por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50µL por poço de 2N H₂SO₄. A medida da absorbância foi feita no leitor de ELISA utilizando filtro de 490nm (Microplate Reader Model 3550 - BioRad).

Os soros obtidos dos cães deste estudo foram testados, em *pool* (n=8), para os quatro pontos de coleta de soro mencionados anteriormente. Um *pool* de soros de animais negativos mantidos na George Washington University foi utilizado como controle negativo da reação.

O título de anticorpo de determinado soro só foi considerado positivo quando o mesmo apresentava um valor de absorbância superior ao valor de absorbância do seu controle negativo correspondente acrescido de 0,100 (BETHONY et al., 2008).

4.16.2. Immunoblotting - “Western Blot”

A análise das frações antigênicas foi realizada através das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e de Western Blot.

Na técnica de Western Blot, as proteínas do parasito são, primeiramente, separadas, de acordo com o seu peso molecular, pela técnica de SDS-PAGE, e depois transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, onde a reação imunológica é processada. A análise imunológica das frações é feita pela imersão das tiras de nitrocelulose em uma solução (soro) contendo os anticorpos específicos para as frações. As tiras são então colocadas em uma solução contendo anti-imunoglobulina conjugada a uma enzima. Para visualizar a ligação antígeno-anticorpo, adiciona-se um substrato específico que, sob a ação da enzima, origina um precipitado quimioluminescente. Este sinal é, por fim, captado em um filme de raio X.

A revelação produz uma série de bandas no filme de raio X que correspondem às proteínas imunogênicas reativas com o soro utilizado. Um padrão de peso molecular permite a identificação de cada antígeno e o conjunto de bandas e seus pesos caracterizam um padrão imunológico, ou

perfil, específico para cada parasito frente ao soro analisado. Ao contrário do ELISA, o Western Blot é capaz de distinguir entre reatividade cruzada e um resultado específico.

As proteínas depois de separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, foram, em seguida, transferidas em tampão de transferência (20% metanol, 18.5 μ M Tris base, 0,14 M Glicina) para uma membrana de nitrocelulose a 20 V por 30 minutos (Semi-dry blot cell transfer - BioRad). A eficiência da transferência foi analisada corando a membrana com vermelho de Ponceau (Sigma). A membrana foi lavada em água corrente até a retirada do excesso de corante.

Para bloquear os sítios não específicos aos anticorpos, a membrana foi incubada com tampão PBS Tween 20 0,3% adicionado de leite em pó desnatado 5% por uma hora, sob agitação. Ao final desta etapa, a membrana foi lavada por três vezes, dez minutos cada, com tampão de lavagem (0,15 M PBS; Tween 0,05%). O anticorpo primário, proveniente do *pool* dos soros dos cães infectados, foi diluído na concentração de 1:2000 em tampão PBS 0.05% Tween 20 e exposto à membrana de nitrocelulose durante 1 hora, sob agitação. Após 3 lavagens, dez minutos cada, com PBS 0,05% Tween 20, a membrana foi exposta ao anticorpo secundário contra IgG total de cão conjugado à enzima peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., USA) diluído na concentração de 1:20000 em tampão PBS 0.05% Tween 20 durante 1 hora, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, dez minutos cada, com tampão PBS 0,05% Tween 20, seguida de mais duas lavagens, dez minutos cada, com PBS 1x. Por fim, a membrana foi revelada com o kit ECL-Amersham Plus (Ge Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante.

Os soros obtidos dos cães deste estudo foram testados, em *pool*, frente a antígenos ES e totais de verme adulto e de larvas L₃. Um *pool* de soros de animais negativos mantidos na George Washington University foi utilizado como controle negativo da reação.

4.17. Espectrometria de massa

4.17.1. Obtenção dos peptídeos e preparo das amostras

Após a corrida eletroforética, as bandas de interesse, coradas por Coomassie brilhante blue R250, foram excisadas do gel com auxílio de lâmina de bisturi nº 15, descoradas com acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, desidratadas com acetonitrila 100%, secadas em *Speed vac* e, posteriormente, tratadas com a enzima tripsina (Promega[®]) por aproximadamente 16 horas a 37° C.

Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram dessalinizados através de micropurificação em ZipTips[®] C18 (Millipore-Bedford, EUA), seguindo recomendações do fabricante.

A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL da amostra mais 0,5 µL da matriz CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) em uma placa MTP AnchorChip 800/384.

4.17.2. Análise dos peptídeos

O espectrômetro de massa utilizado neste trabalho pertence ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais).

Para as análises foi utilizado o espectrômetro de massa sistema MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Alemanha).

Os espectros de MS (espectrometria de massa) e MS/MS (espectrometria de massa em tandem) foram obtidos no modo positivo, o modo de operação da aquisição foi Linear (Laser repetition rate a 50 Hz, Ion source voltage 1 a 20 kV, Ion source voltage 2 a 18,3 kV, Ion source 3 voltage 6,75 kV e number of shots de 200). Para a fragmentação de peptídeos tripsinolisados no PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) foi empregado o método CID (*Collision induced dissociation*).

Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga para cada amostra utilizando-se o programa FlexControl 3.0. As análises dos conjuntos de dados adquiridos foram feitas com o auxílio dos programas FlexAnalysis 3.0 e Biotoools 3.0. O aparelho foi previamente calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I e IV* - Bruker Daltonics).

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa utilizando o *software* MASCOT[®] (PERKINS et al., 1999), o qual também compara massas de peptídeos observados com um banco de dados disponível de massas virtuais de peptídeos obtidos de proteínas proteolisadas *in silico* e faz a identificação das proteínas mais prováveis correspondentes às massas dos peptídeos observados, este tipo de análise que foi utilizada denomina-se *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). O banco de dados utilizado nas análises foi do *Swissprot* 54.4. As ferramentas de busca e análise comparativa de proteínas estão disponíveis na rede mundial de computadores: ExPASy Ferramentas Proteômicas: <http://us.expasy.org/tools/>.

4.18. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5. O tamanho da amostra por grupo experimental (n=8) foi suficiente para discriminar se havia ou não distribuição Gaussiana. Para verificar isso, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnoff e o de Shapiro-Wilk. Para determinar se havia ou não diferença significativa entre as médias dos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do de Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do de Dunn (dados não-paramétricos) foram utilizados. Além destes, o teste de Grubb o qual avaliava se há ou não *outliers* nas amostras, foi também usado. Todos os testes tiveram o intervalo de confiança de 95% com significância para um valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Eliminação de ovos nas fezes (OPG):

A figura 2 a seguir mostra o número de ovos por grama de fezes (OPG) liberados ao longo da infecção, desde o período de patência até próximo ao dia do sacrifício para cada um dos grupos experimentais. Os valores apresentados são médias dos oito cães presentes por grupo. Para as três espécies, o período pré-patente foi semelhante, ou seja, em torno de duas semanas. Além disso, todos apresentaram curvas crescentes de eliminação de ovos. Os grupos parasitados por *A. ceylanicum* e *A. caninum* apresentaram valores máximos na faixa de 20.000-30.000 ovos por grama de fezes enquanto o de *A. braziliense* atingiu valores superiores, na faixa de 40.000-50.000 ovos por grama de fezes.

Para verificar se houve diferença significativa na liberação de ovos nas fezes para os três grupos experimentais, utilizou-se como critério a média de ovos por grama de fezes dos quatro últimos exames feitos por animal (LOUKAS et al., 2005). A figura 3 a seguir mostra o número médio de ovos liberados para os três grupos experimentais. O grupo parasitado pelo *A. braziliense* apresentou a maior média (29.675) seguido pelos grupos de *A. caninum* (21.488) e de *A. ceylanicum* (17.286). Como os dados não apresentaram distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn foram aplicados. A análise estatística dos testes revelou haver diferença significativa ($p=0.0487$) entre as médias dos grupos *A. ceylanicum* e *A. braziliense*.

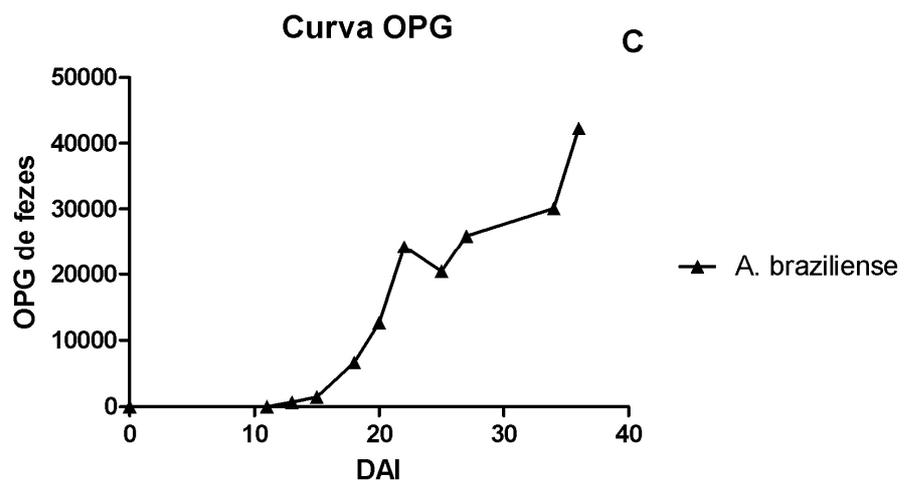
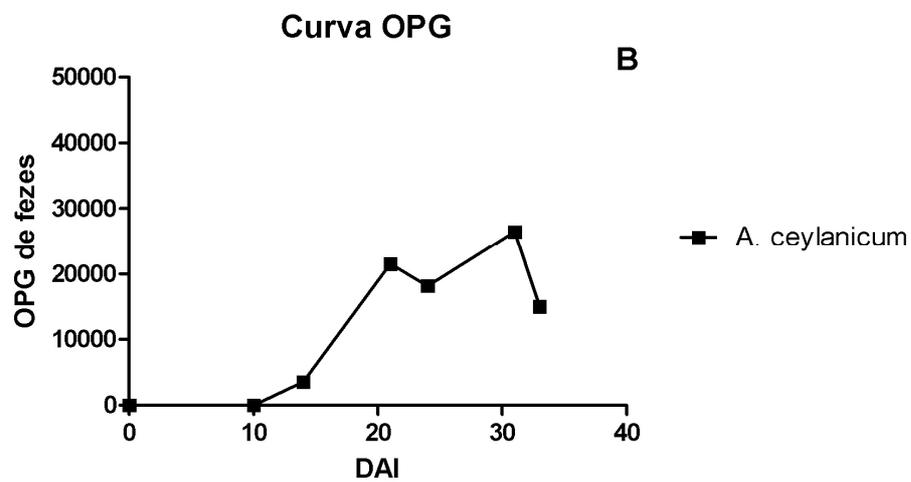
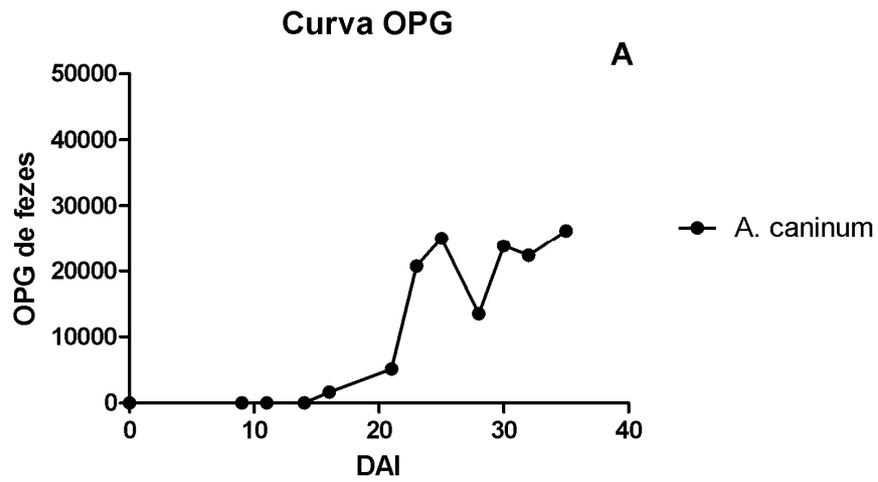


FIGURA 2: Curva de OPG da infecção causada pelas três espécies de *Ancylostoma*. A: *A. caninum*. B: *A. ceylanicum*. C: *A. braziliense*

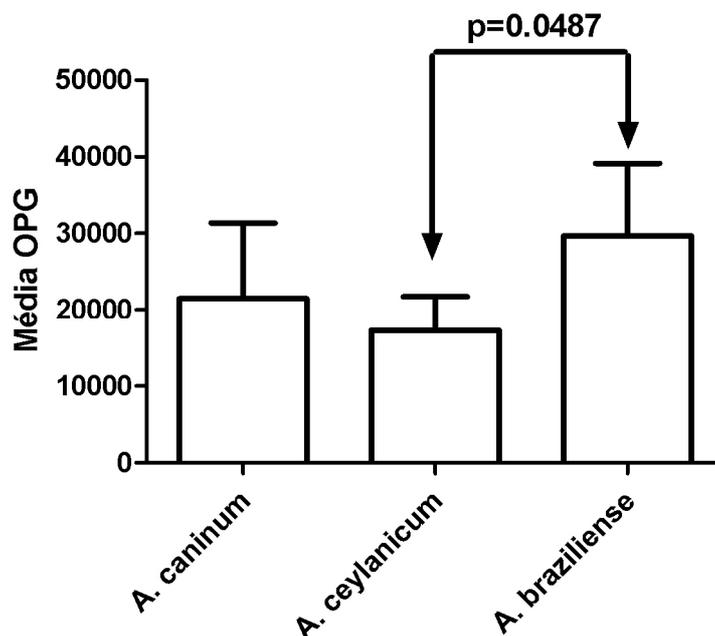


FIGURA 3: Média de ovos liberados por grama de fezes para os três grupos experimentais

5.2 Recuperação dos vermes adultos:

As tabelas 4 e 5 a seguir ilustram a quantidade de vermes recuperados por sexo por animal e a porcentagem de recuperação de vermes em relação à quantidade de larvas de terceiro estágio ingeridas por cão para os 3 grupos experimentais.

A quantidade de vermes recuperados por animal nos diferentes grupos não foi necessariamente proporcional ao número de larvas ingeridas por cada cão (houve variação no número de larvas de acordo com o peso de cada animal). Assim, o cão 4 do grupo de *A. caninum*, que ingeriu a maior quantidade de larvas do grupo (160), foi o que apresentou a segunda menor porcentagem de vermes recuperados para o grupo (Tabela 5). Do mesmo modo esse fato foi também observado para os grupos de infectados por *A. braziliense* e *A. ceylanicum*. O número de vermes fêmeas recuperado foi superior ao de machos para os 3 grupos experimentais (Tabela 4).

TABELA 4: Quantidade de vermes recuperados por sexo por animal para cada grupo infectado pelas diferentes espécies

Cão	<i>A. caninum</i>			<i>A. ceylanicum</i>			<i>A. braziliense</i>		
	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total
1	25	33	58	47	85	132	64	97	161
2	11	28	39	113	165	278	56	78	134
3	40	53	93	64	50	114	51	62	113
4	12	35	47	39	62	101	69	31	100
5	25	29	54	66	52	118	55	71	126
6	31	25	56	54	92	146	34	23	57
7	6	11	17	36	39	75	37	97	134
8	14	22	36	50	48	98	79	94	173
Média	20,50	29,50	50,00	58,63	74,13	132,75	55,63	69,13	124,75
Desvio	11,7	12,0	22,0	24,4	41,1	62,5	15,3	29,0	36,2

TABELA 5: Porcentagem de recuperação de vermes adultos em relação à quantidade de larvas L₃ ingeridas por animal para os 3 grupos experimentais

Cão	<i>A. caninum</i>			<i>A. ceylanicum</i>			<i>A. braziliense</i>		
	ing	rec	%	ing	rec	%	ing	rec	%
1	140	58	41,43	275	132	48,00	290	161	55,52
2	120	39	32,50	275	278	101,09	280	134	47,86
3	150	93	62,00	230	114	49,57	280	113	40,36
4	160	47	29,38	300	101	33,67	320	100	31,25
5	120	54	45,00	320	118	36,88	300	126	42,00
6	125	56	44,80	340	146	42,94	290	57	19,66
7	110	17	15,45	170	75	44,12	210	134	63,81
8	120	36	30,00	210	98	46,67	360	173	48,06
Média	130,63	50,00	37,57	265	132,75	50,37	291,25	124,75	43,56
Desvio	17,4	22,0	14,0	57,8	62,5	21,2	42,2	36,2	13,8

Para verificar se houve diferença significativa com relação à taxa de recuperação de vermes adultos aplicou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, uma vez que as amostras possuíam distribuição normal. A figura 4 a seguir mostra a porcentagem média de recuperação de vermes adultos em relação à quantidade de larvas L₃ ingerida por grupo experimental. O grupo parasitado por *A. braziliense* apresentou a maior porcentagem de recuperação de vermes adultos (43,57%) seguido pelos grupos de *A. ceylanicum* (43,12%) e de *A. caninum* (37,57%). Entretanto, O valor p encontrado (0.5549) mostrou não haver diferença estatística entre os grupos experimentais. Foram desconsiderados os *out-liers* da amostra.

Taxa de recuperação de vermes adultos

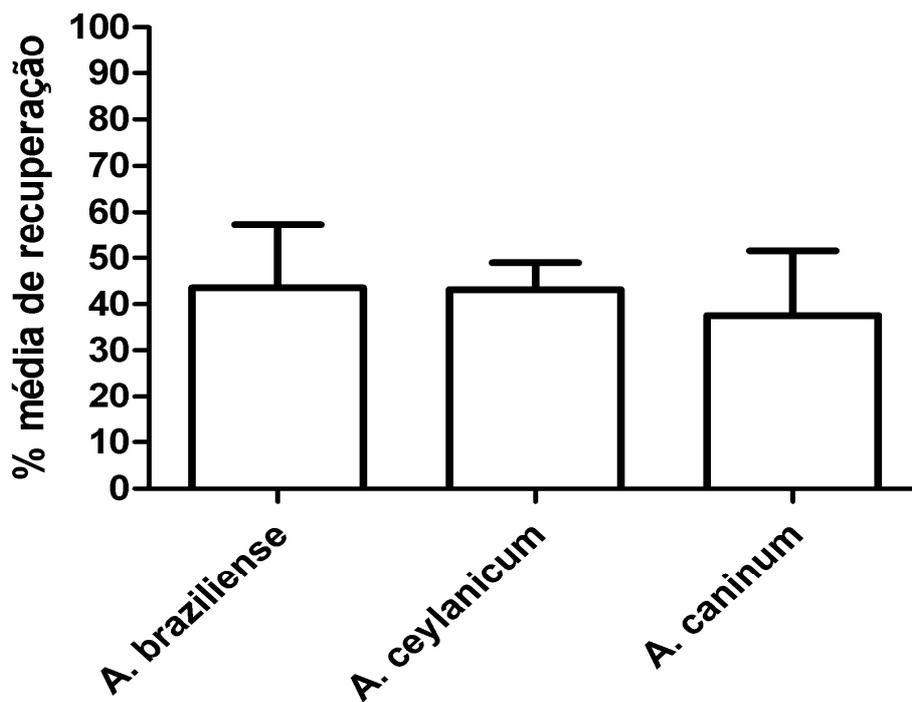


FIGURA 4: Porcentagem média de recuperação de vermes adultos em relação à quantidade de larvas L₃ ingeridas por grupo experimental

5.3 Análises hematológicas:

A figura 5 a seguir demonstra de forma comparativa a variação no número de hemácias ao longo da infecção dos cães para as três espécies deste estudo. Todos os valores apresentados são as médias aritméticas dos oito animais pertencentes a cada grupo experimental. Para cães entre três e seis meses de idade, como os usados nesse trabalho, os valores de referência para o número hemácias é 5,5 a 7 milhões de células por milímetro cúbico de sangue. Portanto, de acordo com os valores encontrados, os animais já apresentavam anemia antes mesmo da infecção. O grupo experimental *A. caninum* apresentou uma curva de decréscimo de hemácias mais acentuada ao longo da infecção. Por outro lado, o grupo infectado por *A. ceylanicum*, apresentou um leve decréscimo no início da infecção com elevação no número de hemácias durante o período analisado.

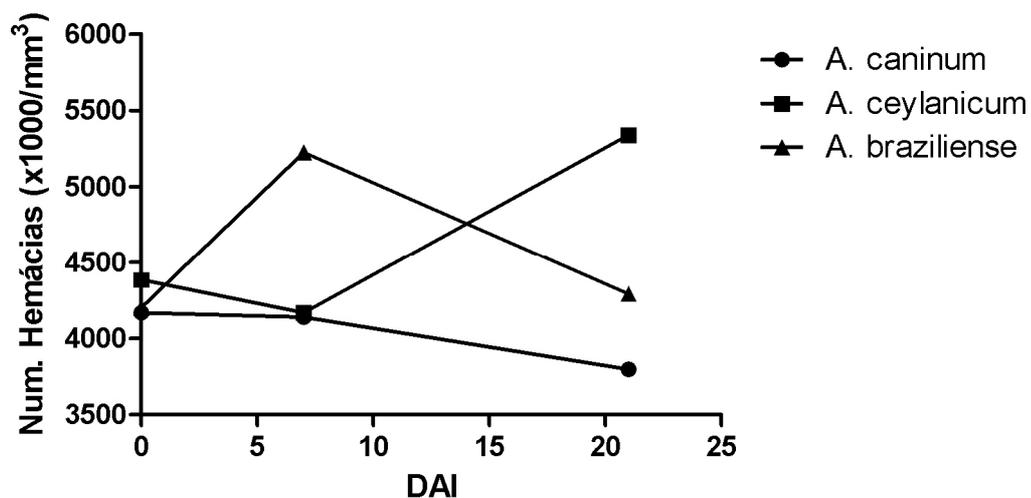


FIGURA 5: Contagem média de hemácias ao longo da infecção canina para as três espécies de ancilostomídeos

Para verificar se houve diferença significativa entre os grupos com relação ao grau de anemia, utilizou-se como critério avaliar a média do número de hemácias em um tempo fixo (21 dias após a infecção). Como os dados apresentavam distribuição normal, os testes ANOVA e de Bonferroni foram

aplicados. O valor p encontrado (0.0191) mostrou haver diferença significativa entre os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum*.

A figura 6 a seguir demonstra de forma comparativa a variação no número total de leucócitos ao longo da infecção dos cães para as três espécies deste estudo. Todos os valores apresentados são as médias aritméticas dos oito animais pertencentes a cada grupo experimental. Para cães entre três e seis meses de idade os valores de referência para o número total de leucócitos é 8 a 16 mil células por milímetro cúbico de sangue. Todos os três grupos permaneceram dentro da faixa de referência durante todo o período de experimentação. O grupo de *A. caninum* demonstrou um perfil diferente em relação aos outros dois grupos experimentais. Somente este apresentou um aumento no número de glóbulos brancos ao longo da infecção.

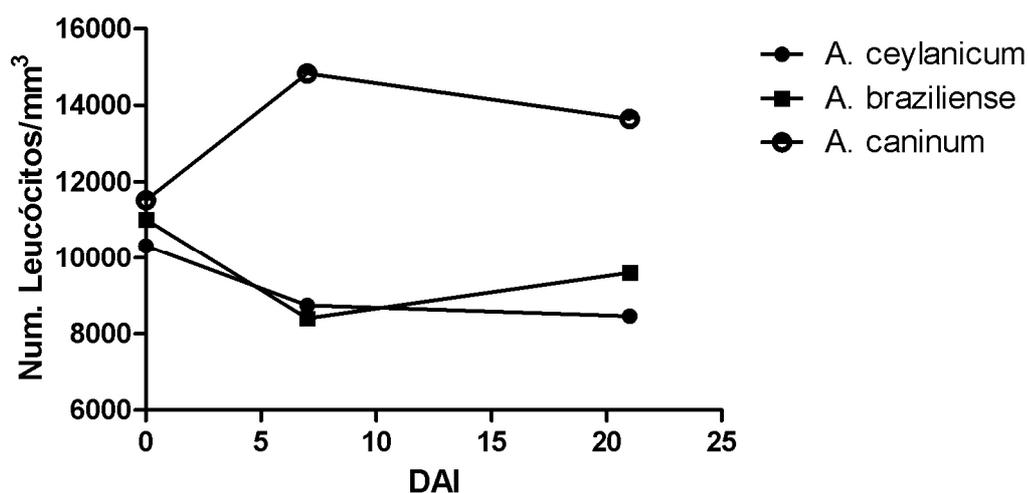


FIGURA 6: Contagem média de leucócitos ao longo da infecção canina para as três espécies de ancilostomídeos

Para verificar se houve diferença significativa entre os grupos com relação ao número de leucócitos utilizou-se como critério avaliar a média dos oito animais em um tempo fixo (21 dias após a infecção). Como os dados apresentavam distribuição normal, os testes ANOVA e de Bonferroni foram aplicados. O valor p encontrado (0.0084) mostrou haver diferença significativa novamente entre os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum*.

5.4 Dosagem dos antígenos totais e de ES de larvas L3 e de vermes adultos:

A tabela 6 a seguir apresenta as concentrações de proteínas expressas em mg/mL obtidas com o auxílio do kit comercial (Pierce BCA kit, Pierce, USA). Estão listadas as concentrações dos antígenos excretados e secretados e dos antígenos totais das fases de larva de terceiro estágio e de vermes adultos para as três espécies deste estudo, totalizando doze tipos de antígenos diferentes.

TABELA 6: Dosagem das proteínas excretadas e secretadas e das proteínas totais de larvas L₃ e de vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos

Tipo de antígeno	Concentração BCA Kit (mg/mL)
ES L3 <i>A. caninum</i>	1,08
ES L3 <i>A. ceylanicum</i>	1,80
ES L3 <i>A. braziliense</i>	6,54
ES Verme <i>A. caninum</i>	2,50
ES Verme <i>A. ceylanicum</i>	1,52
ES Verme <i>A. braziliense</i>	2,35
Ag Total L3 <i>A. caninum</i>	4,65
Ag Total L3 <i>A. ceylanicum</i>	3,21
Ag Total L3 <i>A. braziliense</i>	6,93
Ag Total Verme <i>A. caninum</i>	2,61
Ag Total Verme <i>A. ceylanicum</i>	3,18
Ag Total Verme <i>A. braziliense</i>	6,14

5.5 Resposta imune humoral:

A figura 7 a seguir apresenta de forma comparativa os títulos de anticorpos da imunoglobulina G (IgG) total ao longo da infecção que reconheceram especificamente os antígenos totais das fases de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos estudadas.

O reconhecimento dos anticorpos contra os antígenos totais de larva não foram expressivos para os grupos *A. ceylanicum* e *A. braziliense* em nenhum dos quatro pontos de coleta de soro. Já para o grupo *A. caninum*, o título foi de 1:4.500 no dia do sacrifício.

Os títulos de anticorpos frente aos antígenos totais de vermes adultos foram maiores que os obtidos para os antígenos de larva, exceto para o grupo de *A. ceylanicum* que manteve-se com baixos títulos independente do tipo de antígeno. Já os grupos *A. caninum* e *A. braziliense* responderam, de forma diferente, aos antígenos totais. O grupo *A. caninum* apresentou título (1:1.500) no período de início da patência e terminou com um título de 1:13500 no dia do sacrifício. O grupo de *A. braziliense* apresentou título expressivo (1:13.500) apenas no dia do sacrifício.

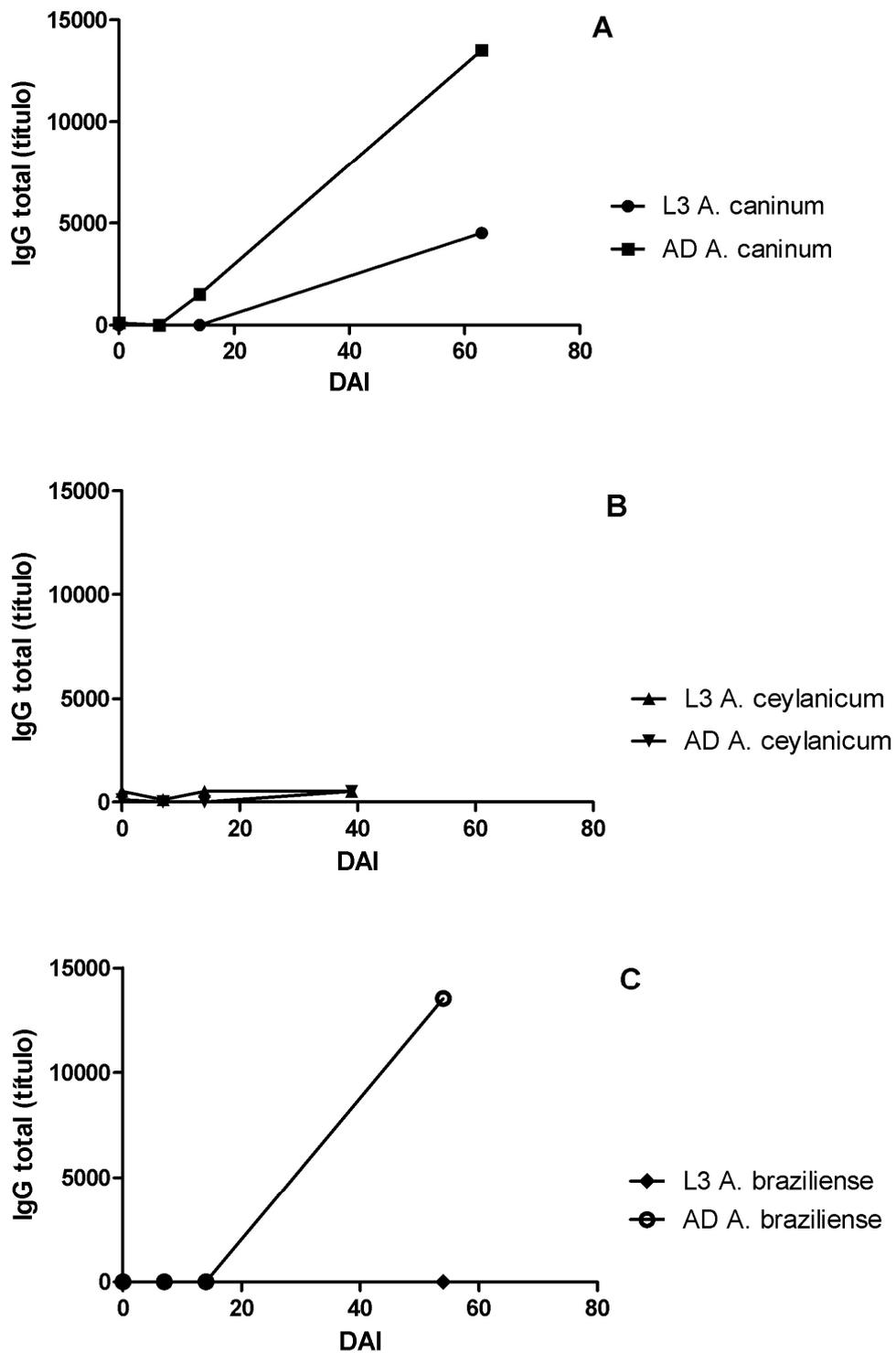


FIGURA 7: Títulos de anticorpos IgG total frente aos antígenos totais de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos ao longo da infecção. **A:** *A. caninum*. **B:** *A. ceylanicum*. **C:** *A. braziliense*. **L3:** larva terceiro estágio. **AD:** verme adulto. **DAI:** dias após a infecção.

A figura 8 a seguir apresenta de forma comparativa os títulos de anticorpos da imunoglobulina IgG total ao longo da infecção que reconheceram especificamente os antígenos secretados e excretados (ES) das fases de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos estudadas.

O reconhecimento dos anticorpos contra os antígenos ES foi superior se comparado aos antígenos totais, alcançando títulos três vezes maiores (1:40.500).

Tanto para os antígenos totais quanto para os antígenos ES de larva e de verme adulto, o grupo *A. ceylanicum* demonstrou-se não responsivo. Contra os antígenos ES de larva, o grupo *A. braziliense* também não apresentou títulos consideráveis em nenhum dos quatro pontos de coleta de soro. Já para o grupo *A. caninum*, obteve-se título considerável (1:4.500), contra antígenos ES de larva, apenas no dia de sacrifício.

Os títulos de anticorpos frente aos antígenos ES de vermes adultos foram maiores que os obtidos para os antígenos ES de larva, exceto para o grupo de *A. ceylanicum* que manteve-se com baixos títulos independente do tipo de antígeno. Já os grupos *A. caninum* e *A. braziliense* responderam, em níveis diferentes, aos antígenos ES de verme adulto. O grupo *A. caninum* obteve títulos altos (1:40.500) desde o período de início da patência até o dia de sacrifício. O grupo de *A. braziliense* apresentou título vinte e sete vezes menor que o grupo de *A. caninum* no dia de início da patência (1:1.500) e alcançou título igual (1:40.500) no dia do sacrifício.

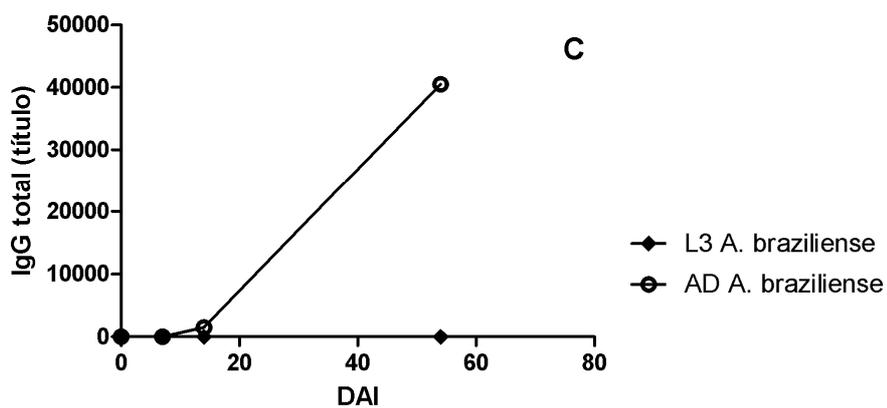
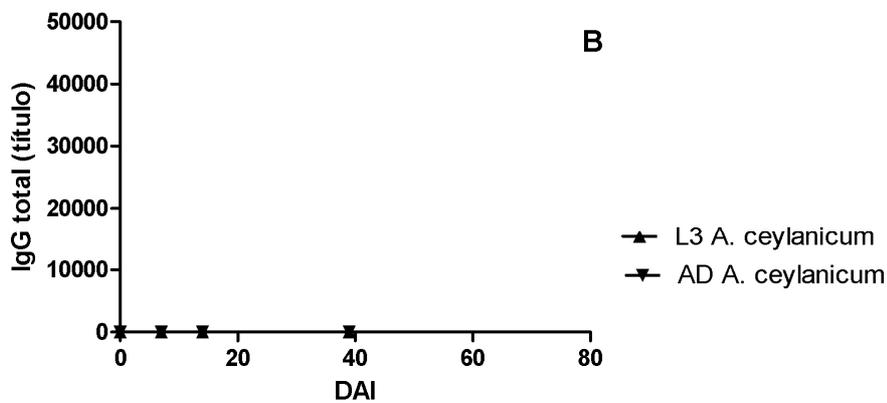
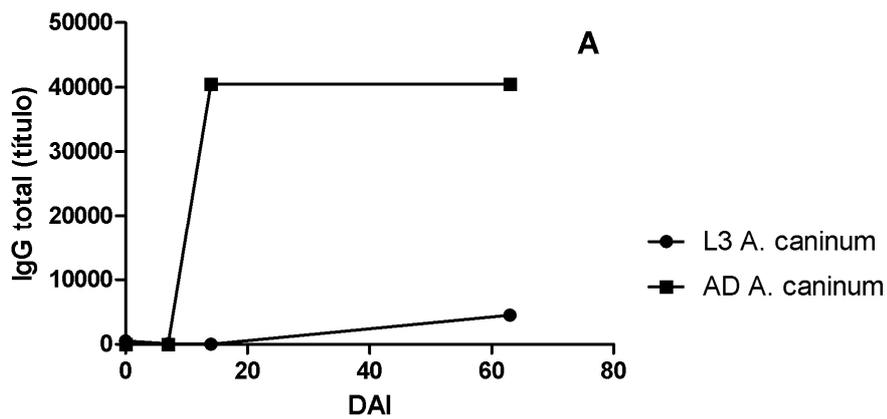


FIGURA 8: Títulos de anticorpos IgG total frente aos antígenos secretados e excretados de larva de terceiro estágio e verme adulto para as três espécies de ancilostomídeos ao longo da infecção. **A:** *A. caninum*. **B:** *A. ceylanicum*. **C:** *A. braziliense*. **L3:** larva terceiro estágio. **AD:** verme adulto. **DAI:** dias após a infecção.

5.6 Perfis eletroforéticos dos proteomas de larvas L₃ e de vermes adultos:

As figuras a seguir ilustram os perfis eletroforéticos de proteínas totais e de produtos ES das fases de larvas de terceiro estágio e de vermes adultos para as três espécies de ancilostomídeos analisadas neste trabalho.

São apresentados géis corados por azul de Coomassie e por nitrato de prata. Em uma análise geral destes perfis protéicos percebe-se que os géis corados por nitrato de prata mostraram-se muito mais sensíveis que os corados pelo azul de Coomassie, demonstrando a grande diversidade protéica que os ancilostomídeos possuem tanto para os extratos totais quanto para os produtos ES. Outra característica é a mudança que ocorre nos perfis tanto de extratos totais quanto no de produtos ES, quando se compara as fases de larva infectante e verme adulto, característica essa já esperada. Todos os perfis apresentaram proteínas dos mais variados pesos moleculares.

Os perfis protéicos para extratos totais tanto de larva quanto de verme, mostraram grande quantidade de proteínas aparentemente compartilhadas entre as três espécies. Entretanto, diferenças como bandas presentes em duas espécies e ausente em uma terceira e bandas mais expressas em uma espécie do que nas outras, podem também ser observadas. Como exemplos temos: 1) uma proteína de 26 kDa compartilhada entre as três espécies no perfil protéico de extrato total de larva infectante (Figura 11, canaletas 2,3 e 4) ; 2) uma proteína de 54 kDa compartilhada entre as três espécies no perfil protéico de extrato total de verme adulto (Figura 11, canaletas 5, 6 e 7) e 3) uma dupla de proteínas de 80 e 85 kDa presentes no extrato total de verme adulto de *A. caninum* e *A. ceylanicum* e ausente em *A. braziliense* (Figura 11, canaletas 5 e 6).

Os perfis protéicos de produtos ES tanto de larva quanto de verme adulto mostraram-se muito mais divergentes entre as espécies do que os perfis de extratos totais. Nestes é possível identificar um número maior de proteínas específicas do que compartilhadas entre as três espécies deste trabalho. Como exemplos temos: 1) uma proteína de 45 kDa e outra de 19 kDa específicas de *A. caninum* no perfil de produtos ES de verme adulto (Figura 12, canaleta 5); 2) uma proteína de 35 kDa e outra de 22 kDa específicas de *A. ceylanicum* no

perfil de produtos ES de verme adulto (Figura 12, canaleta 6) e 3) uma proteína de 56 kDa e outra de 38 kDa específicas de *A. braziliense* no perfil de produtos ES de verme adulto (Figura 12, canaleta 7).

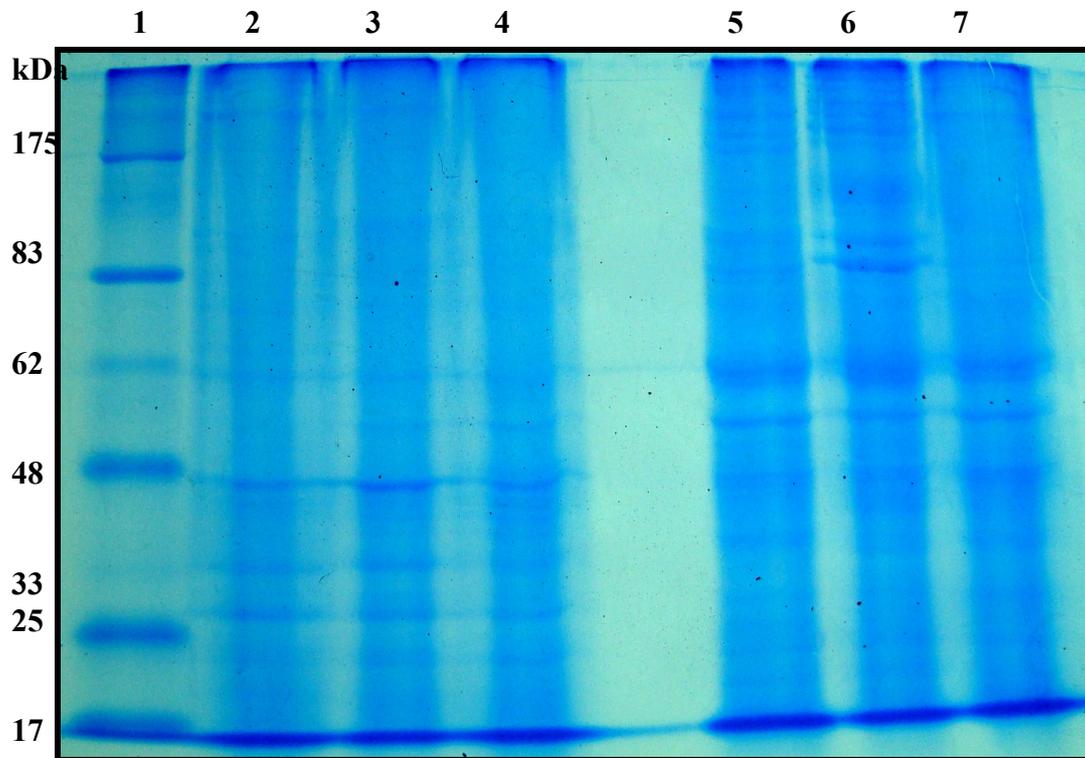


FIGURA 9: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando o perfil protéico de extrato total de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaletas 2: extrato total de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: extrato total de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: extrato total de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: extrato total de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: extrato total de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: extrato total de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton.

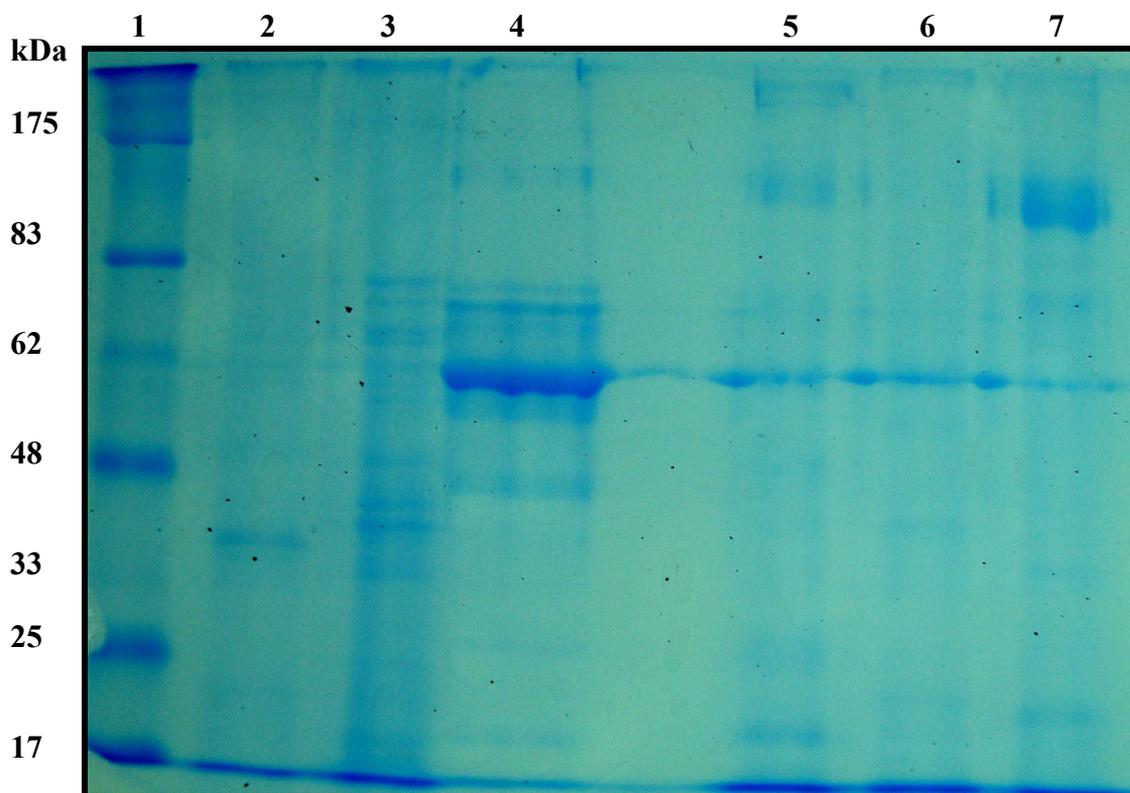


FIGURA 10: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando o perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: ES de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: ES de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: ES de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: ES de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: ES de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: ES de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton

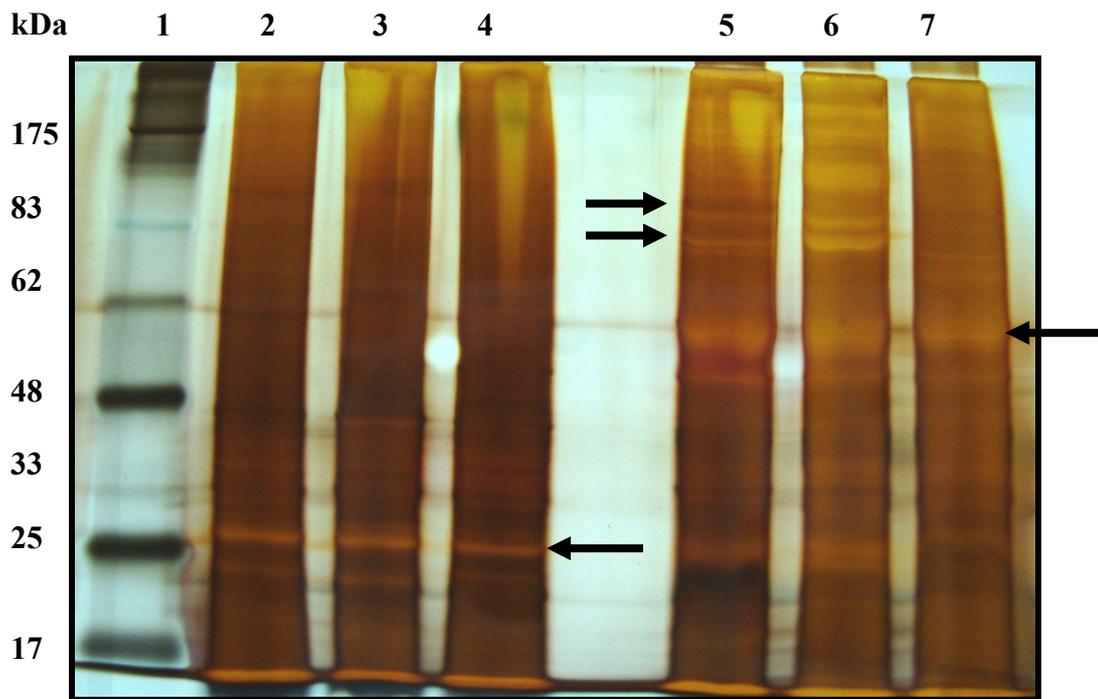


FIGURA 11: Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata mostrando o perfil protéico de extrato total de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: Ag total de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: Ag total de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: Ag total de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: Ag total de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: Ag total de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: Ag total de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton

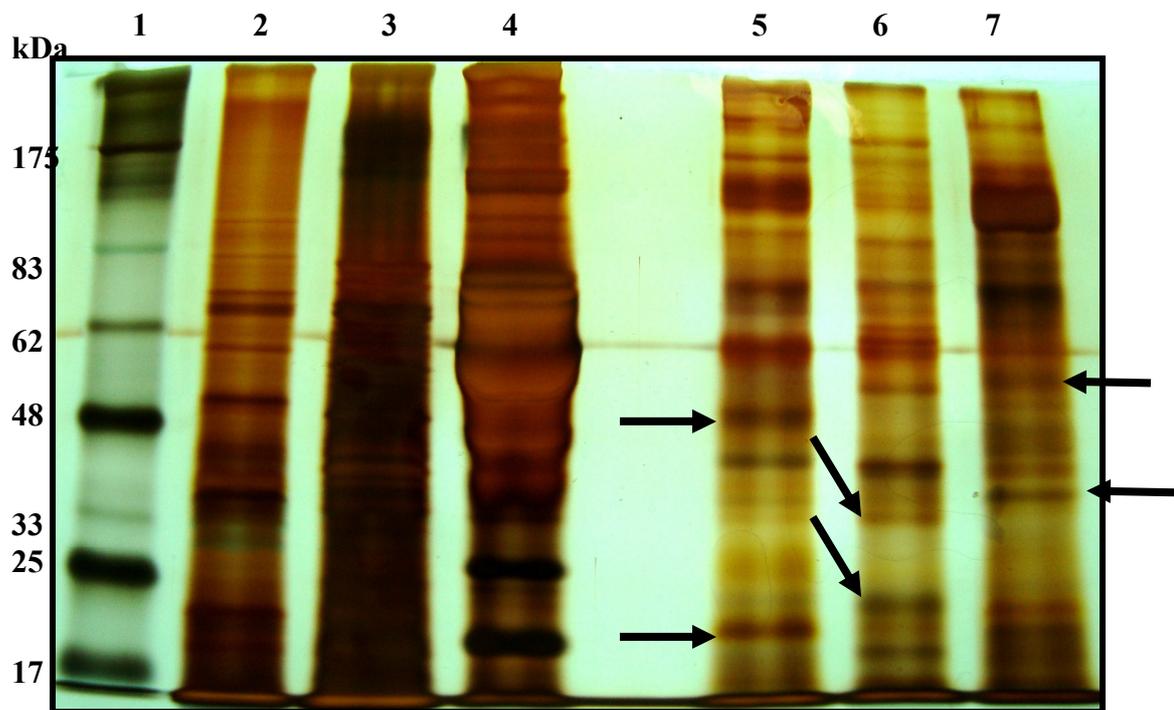


FIGURA 12: Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata mostrando o perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: ES de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: ES de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: ES de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: ES de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: ES de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: ES de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton

5.7 Perfis imunogênicos:

As figuras 13 e 14 a seguir mostram os perfis imunogênicos obtidos a partir do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos coletados no dia do sacrifício dos mesmos frente aos antígenos totais de larva de terceiro estágio e vermes adultos para as três espécies sob diferentes tempos de exposição ao filme auto-radiográfico (1 e 3 minutos de exposição).

Tanto nos perfis imunogênicos frente aos antígenos totais de larva quanto para os de verme adulto ocorreram reconhecimento específico e reação cruzada para os soros dos cães infectados com as três espécies. Outro ponto a ser considerado é o aumento da intensidade e do número de bandas reconhecidas pelos soros à medida que aumenta o tempo de exposição ao filme auto-radiográfico, inclusive para o controle negativo.

Mesmo com reatividade cruzada, os perfis imunogênicos são diferentes entre as espécies para os três *pools* avaliados, tanto contra antígenos totais de larva quanto de verme adulto. Como exemplos temos: 1) uma proteína de 23 kDa de antígeno total de larva infectante que foi reconhecida nas três espécies pelos *pools* de soros de cães infectados com as três espécies (Figura 13, canaletas 1, 2 e 3, 1 minuto); 2) uma proteína de 90 kDa de antígeno total de verme adulto que foi reconhecida apenas para a espécie de *A. ceylanicum* pelo *pool* de soro de cães parasitados pela mesma espécie (Figura 14, canaleta 2, 1 minuto) e 3) uma proteína de 16 kDa de antígeno total de verme adulto que foi reconhecida apenas para a espécie de *A. braziliense* pelo *pool* de soro de cães parasitados pela mesma espécie (Figura 14, canaleta 3, 1 minuto).

As figuras 15 e 16 a seguir mostram os perfis imunogênicos obtidos a partir do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos coletados no dia do sacrifício dos mesmos, frente aos antígenos ES de larva de terceiro estágio e de verme adulto para as três espécies sob diferentes tempos de exposição ao filme auto-radiográfico (1 e 3 minutos de exposição).

Os perfis imunogênicos frente aos antígenos ES de larva e verme adulto apresentaram um número bem menor de bandas reativas do que os perfis com antígenos totais. Aqui também ocorreu o aumento da intensidade e do número

de bandas reconhecidas pelos soros à medida que aumenta o tempo de exposição ao filme auto-radiográfico, inclusive para o controle negativo. O *pool* de soros de animais infectados com *A. braziliense* foi o mais reativo e o menos reativo foi o *pool* soros de *A. ceylanicum*. Como exemplos temos: 1) uma proteína de 133 kDa de antígeno ES de verme adulto que foi reconhecida nas espécies de *A. braziliense* e *A. caninum* pelo *pool* de soro de cães parasitados pela espécie *A. braziliense* (Figura 16, canaletas 1 e 3, 1 minuto) e 2) uma proteína de 20 kDa de antígeno ES de verme adulto que foi reconhecida apenas para a espécie de *A. caninum* pelo *pool* de soro de cães parasitados pela espécie *A. braziliense* (Figura 16, canaleta 1, 1 minuto).

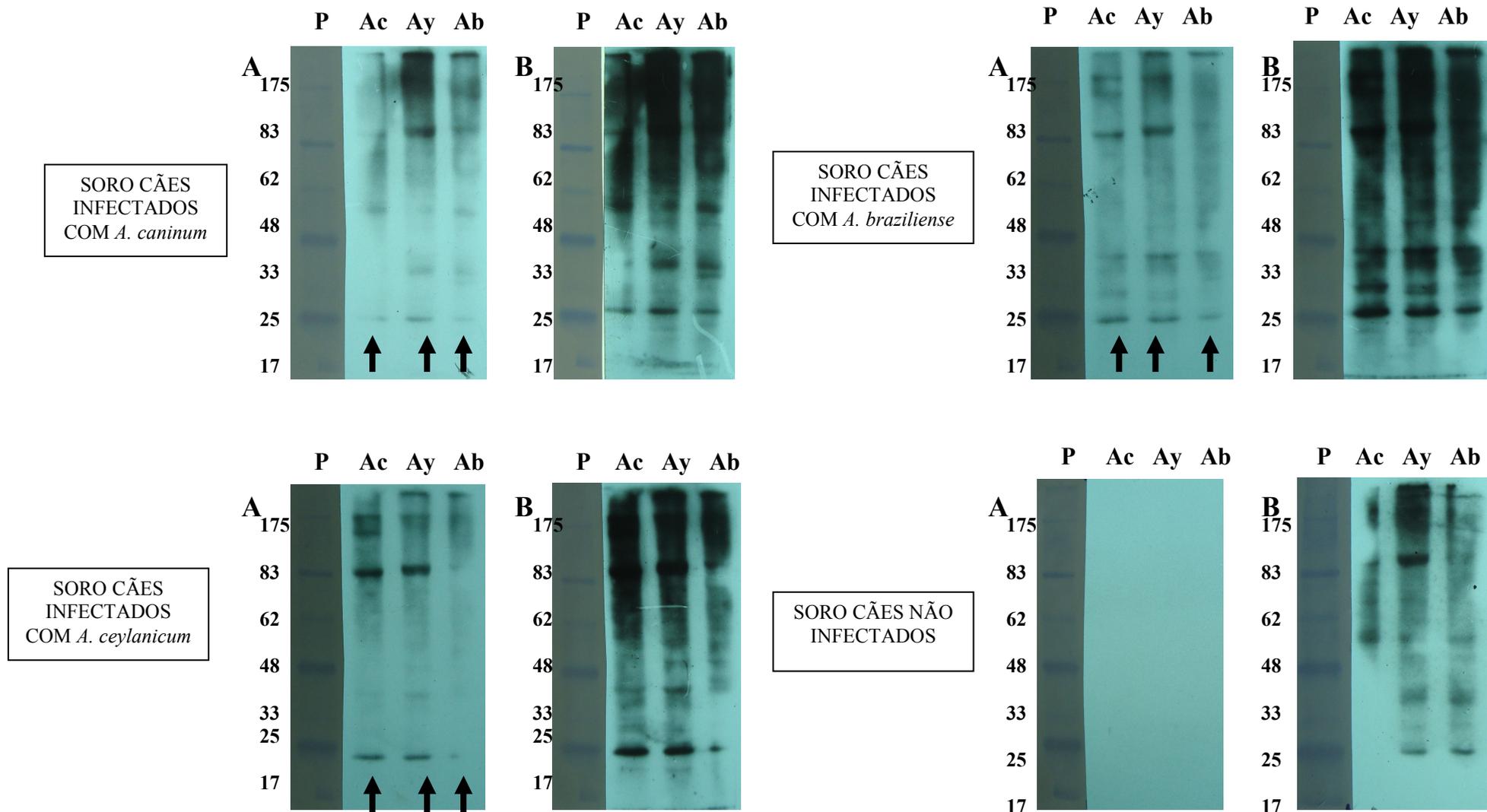


Figura 13: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos totais de larva de terceiro estágio para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição. P: padrão de peso molecular. 1: antígeno de *A. caninum*. 2: antígeno de *A. ceylanicum*. 3: antígeno de *A. braziliense*. A: 1 minuto. B: 3 minutos.

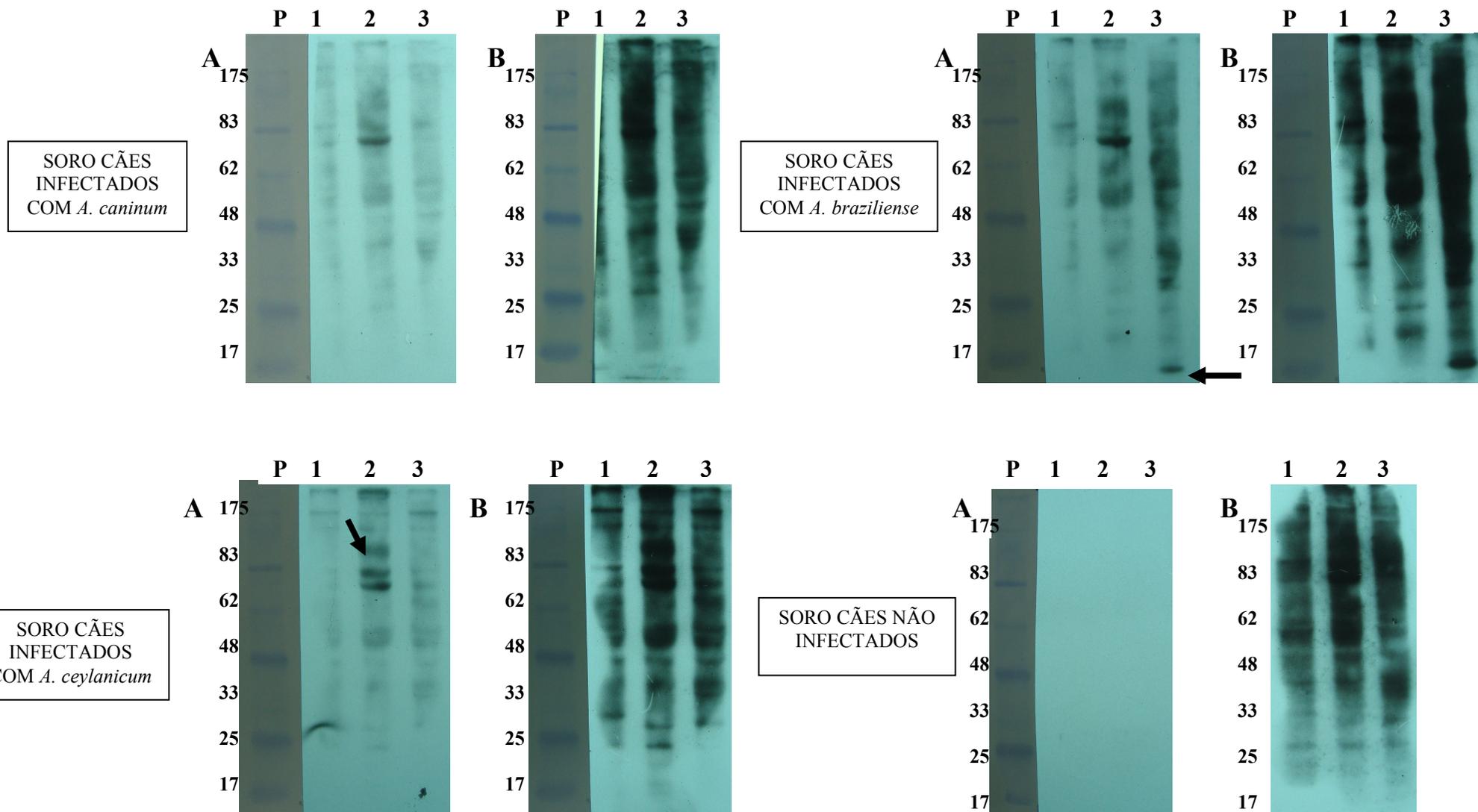


Figura 14: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos totais de vermes adultos para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição. P: padrão de peso molecular. 1: antígeno de *A. caninum*. 2: antígeno de *A. ceylanicum*. 3: antígeno de *A. braziliense*. A: 1 minuto. B: 3 minutos

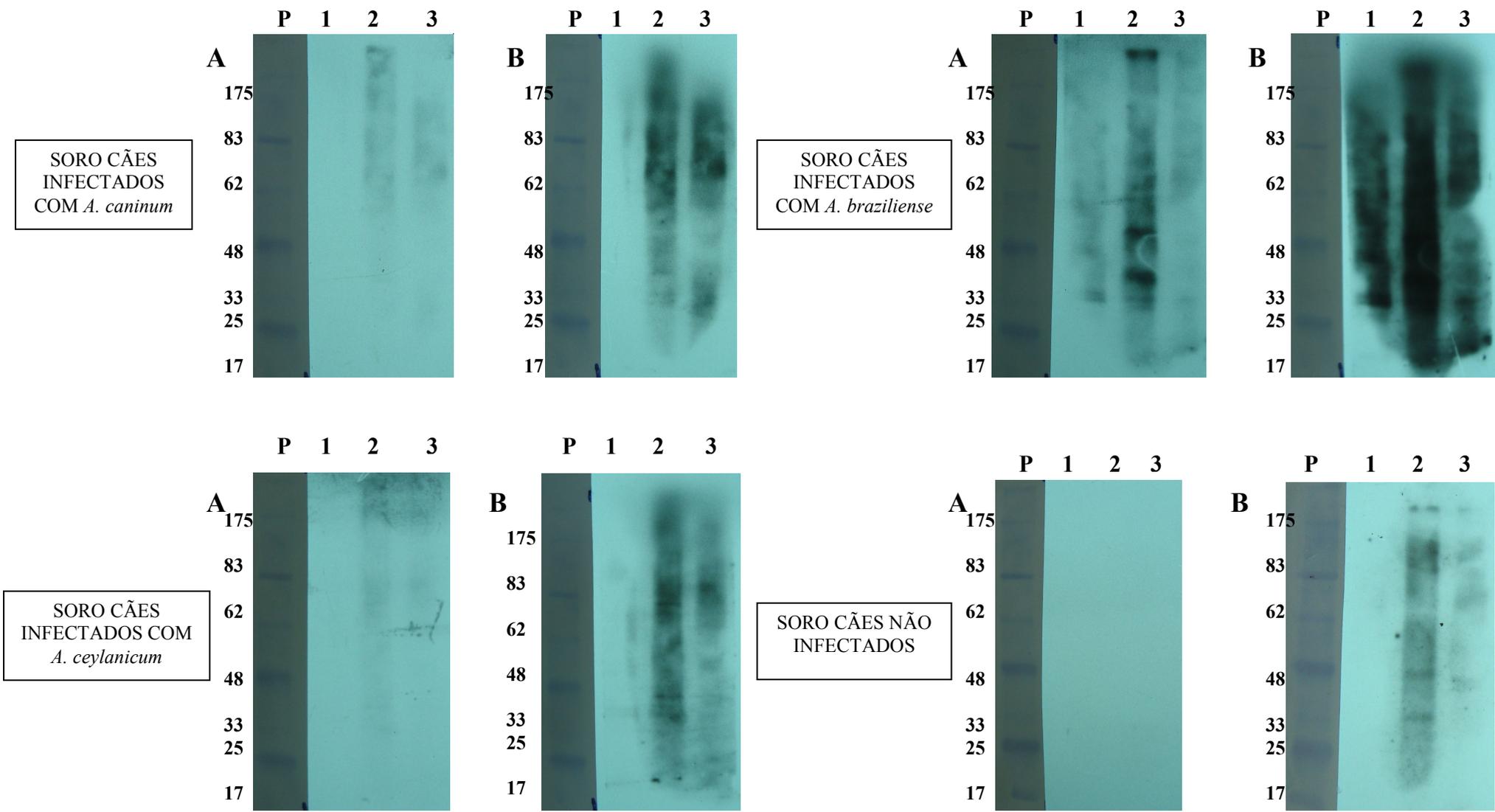
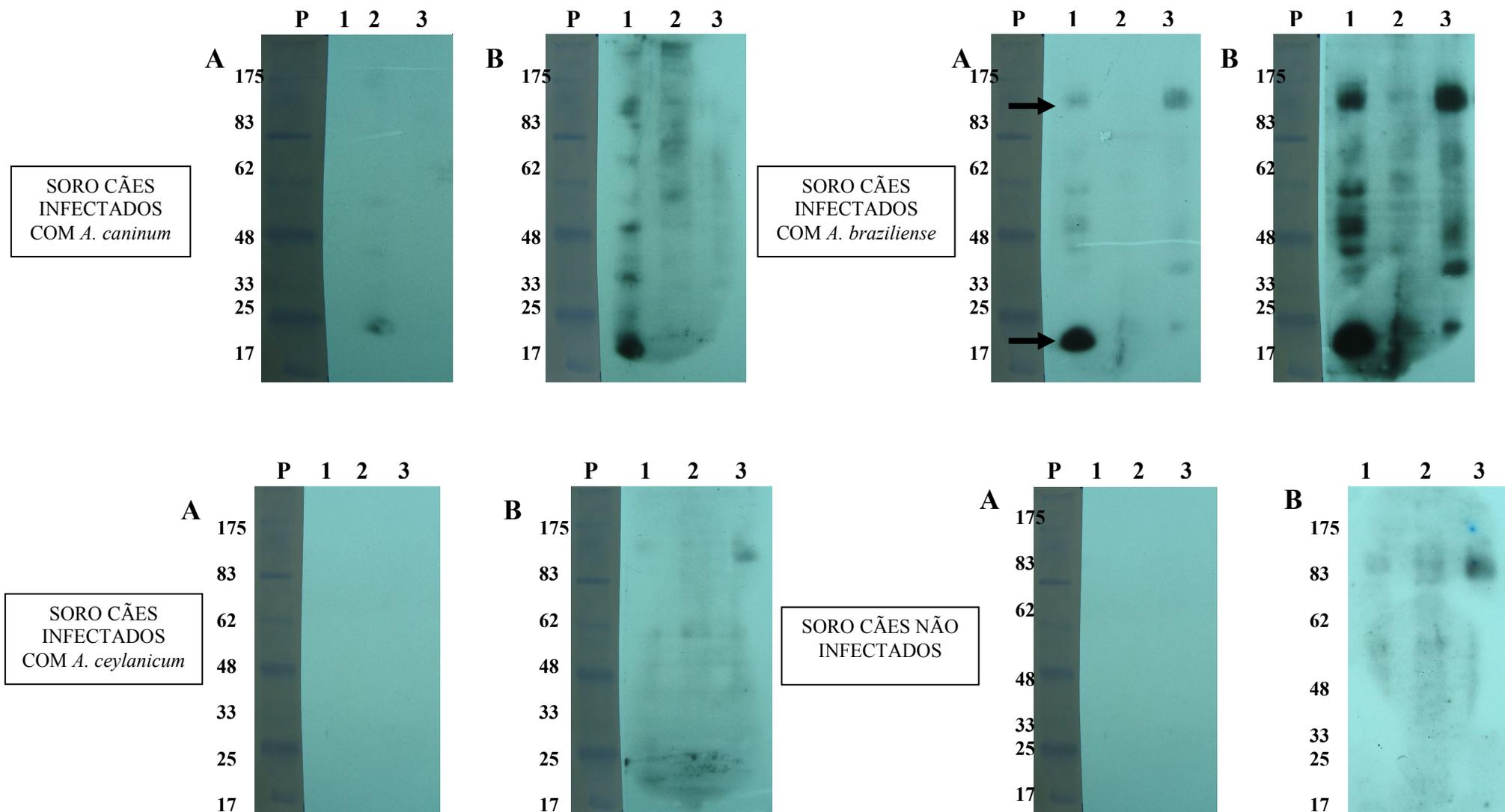


Figura 15: Perfis imunogênicos do reconhecimento do *pool* de soros dos animais infectados para as três espécies de ancilostomídeos frente aos antígenos ES de larvas de terceiro estágio para as três espécies estudadas sob diferentes tempos de exposição. P: padrão de peso molecular. 1: antígeno de *A. caninum*. 2: antígeno de *A. ceylanicum*. 3: antígeno de *A. braziliense*. A: 1 minuto. B: 3 minutos.



5.8 Espectrometria de massa:

As figuras 17 e 18 mostram as bandas de interesse (tanto espécie-específicas quanto compartilhadas entre as espécies) recuperadas dos géis de poliacrilamida para identificação no espectrômetro de massa dos perfis protéicos de produtos excretados e secretados e de extratos totais de larvas de terceiro estágio e de vermes adultos para as três espécies de ancilostomídeos respectivamente.

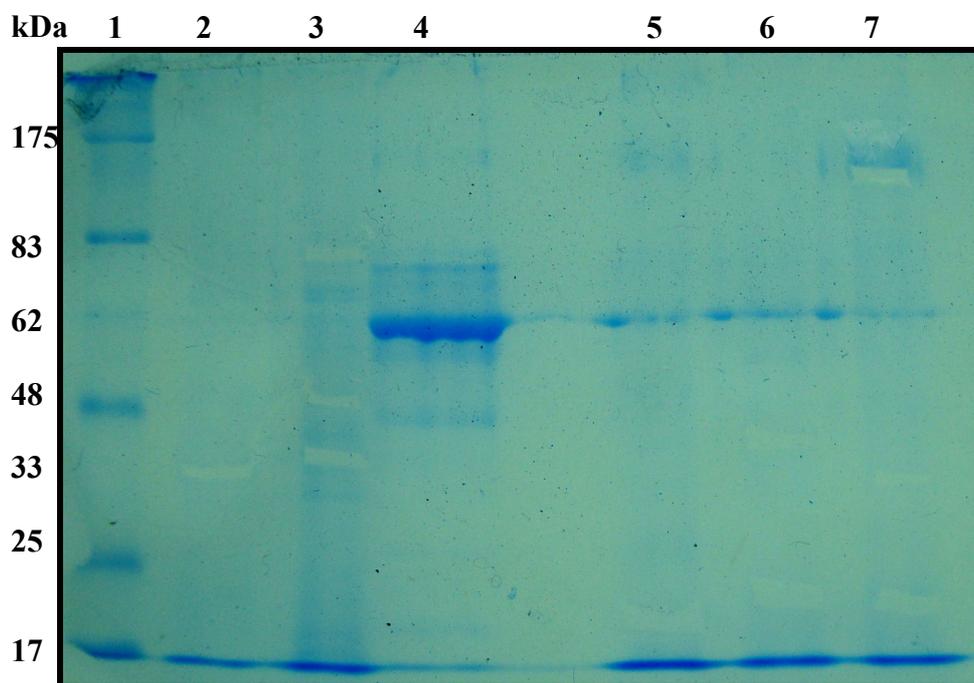


FIGURA 17: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando as bandas de interesse para identificação por espectrometria de massa do perfil protéico de produtos excretados e secretados (ES) de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: ES de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: ES de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: ES de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: ES de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: ES de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: ES de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton

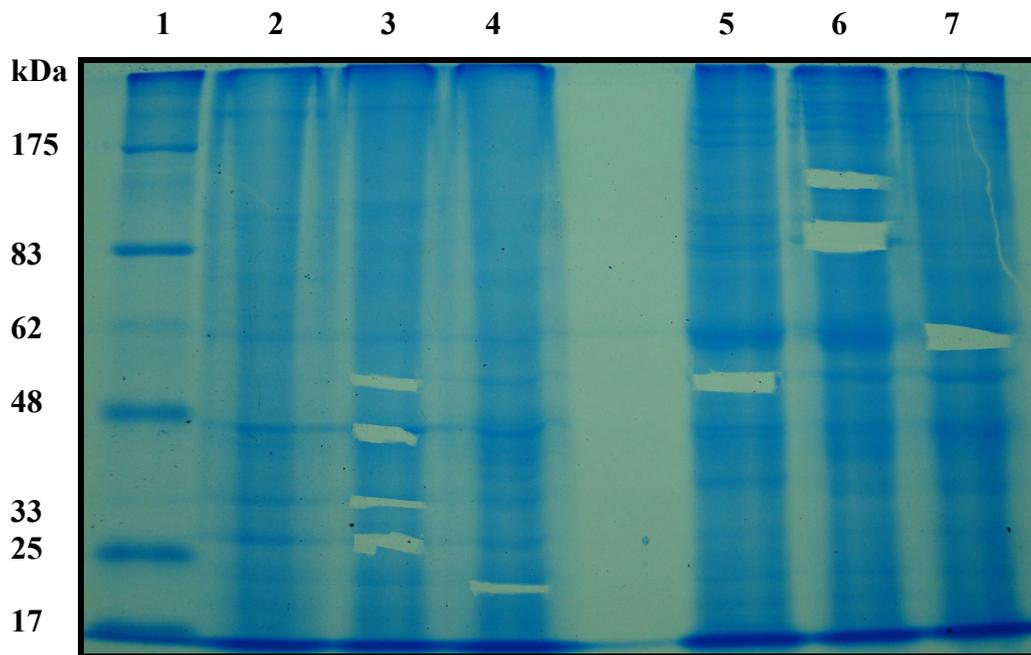


FIGURA 18: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie mostrando as bandas de interesse para identificação por espectrometria de massa do perfil protéico de extratos totais de larvas L₃ e vermes adultos das três espécies de ancilostomídeos. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: Ag total de L₃ *A. caninum*. Canaleta 3: Ag total de L₃ *A. ceylanicum*. Canaleta 4: Ag total de L₃ *A. braziliense*. Canaleta 5: Ag total de verme adulto *A. caninum*. Canaleta 6: Ag total de verme adulto *A. ceylanicum*. Canaleta 7: Ag total de verme adulto *A. braziliense*. kDa: kilodalton

A tabela 7 a seguir apresenta os resultados obtidos com a análise dos espectros gerados pelo espectrômetro de massa das proteínas de interesse dos perfis protéicos de produtos ES e de extratos totais de larvas e vermes adultos para as três espécies de ancilostomídeos. Das vinte e duas amostras selecionadas apenas cinco tiveram identificação significativa (marcadas em **negrito**).

Amostra	Proteoma	Canaleta	Tamanho estimado (kDa)	Resultado
1	ES de larva	2	44	Seqüência peptídica não significativa
2	ES de larva <i>A. ceylanicum</i>	3	48	Fosfoglicerato quinase (<i>Enterococcus faecalis</i>)
3	ES de larva	3	80	Seqüência peptídica não significativa
4	ES de larva	3	45	Seqüência peptídica não significativa
5	ES de verme adulto	5	26	Seqüência peptídica não significativa
6	ES de verme adulto	6	45	Seqüência peptídica não significativa
7	ES de verme adulto	7	40	Amostra não identificada
8	ES de verme adulto	7	62	Seqüência peptídica não significativa
9	Ag total de larva	3	50	Amostra não identificada
10	Ag total de verme adulto	5	50	Seqüência peptídica não significativa
11	Ag total de verme adulto <i>A. braziliense</i>	7	60	Proteína hipotética ZK829.4 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
12	Ag total de verme adulto <i>A. braziliense</i>	7	65	Proteína hipotética CBG06199 (<i>Caenorhabditis briggsae</i>)
13	Ag total de verme adulto	6	83	Seqüência peptídica não significativa

Amostra	Proteoma	Canaleta	Tamanho estimado (kDa)	Resultado
14	Ag total de verme adulto	6	83	Seqüência peptídica não significativa
15	Ag total de verme adulto	6	120	Seqüência peptídica não significativa
16	Ag total de larva	3	33	Seqüência peptídica não significativa
17	Ag total de larva <i>A. ceylanicum</i>	3	36	Ancylostoma secreted protein 1 – ASP-1 (<i>A. ceylanicum</i>)
18	Ag total de larva	3	34	Seqüência peptídica não significativa
19	Ag total de larva	4	30	Seqüência peptídica não significativa
20	ES de verme adulto	6	19	Amostra não identificada
21	ES de verme adulto	7	24	Seqüência peptídica não significativa
22	ES de larva <i>A. braziliense</i>	4	60	Albumina sérica de boi (<i>Bos taurus</i>)

TABELA 7: Resultados obtidos com a análise dos espectros gerados pelo espectrômetro de massa das proteínas de interesse dos perfis de produtos ES e de extratos totais de larvas e vermes adultos para as três espécies de ancilostomídeos

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Poucos estudos na literatura se propuseram a avaliar de forma comparativa a infecção primária de cães às diferentes espécies de ancilostomídeos, principalmente levando em consideração aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares. A maioria deles são das décadas de setenta e oitenta do século passado. Um exemplo foi o estudo de VETTER e colaboradores (1977) que comparou a migração da larva de terceiro estágio no hospedeiro canino para três espécies de ancilostomídeos, as mesmas analisadas neste estudo. Foi observado um padrão similar de migração da larva no hospedeiro, porém ocorreu significativa diferença no que diz respeito à velocidade com que a larva se movimenta, sendo no grupo infectado pelo *A. braziliense* que as larvas apresentaram migração mais rápida se comparado aos outros dois grupos.

Outros trabalhos que se propuseram a avaliar diferentes aspectos da relação *Ancylostoma* e hospedeiro canino, em uma infecção primária, o fizeram para uma única espécie do gênero infectando o cão com diferentes doses do parasito (HOTEZ et al., 2002; CARROLL et al., 1984). Estudos com esse objetivo são praticamente inexistentes para o *A. braziliense*.

A curva de liberação de ovos por grama de fezes obtida no presente trabalho, seguiu padrão semelhante aos estudos citados anteriormente. Para as três espécies trabalhadas, a curva apresentou-se crescente com o passar do tempo, sendo o período pré-patente o mesmo: aproximadamente duas semanas. O grupo parasitado pelo *A. braziliense* apresentou a maior média de ovos por grama de fezes (29.675) seguido do grupo de *A. caninum* (21.488) e, por último, o grupo de *A. ceylanicum* (17.286). A análise estatística revelou haver diferença significativa entre as médias dos grupos *A. ceylanicum* e *A. braziliense*, sendo o primeiro menos fecundo.

Este estudo encontrou taxas de recuperação de vermes adultos semelhantes ao estudo de HOTEZ e colaboradores (2002). As taxas de recuperação para este último estudo ficaram entre 28 a 48% considerando três diferentes doses de larvas de *A. caninum*. O grupo parasitado pelo *A. braziliense* apresentou a maior porcentagem de recuperação de vermes adultos (43,57%) seguido do grupo de *A. ceylanicum* (43,12%) e, por último, o

grupo de *A. caninum* (37,57%). A análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os grupos experimentais. Estudos anteriores já demonstraram taxas bem superiores de recuperação como o de MILLER (1965) cuja recuperação de vermes para a espécie *A. caninum* foi de 78%. Uma possível explicação para isso estaria na via de infecção dos cães, pois, no estudo de MILLER, os animais foram infectados subcutaneamente e não por via oral como foi o caso do trabalho de Hotez e colaboradores (2002) e do nosso trabalho.

Com relação às análises hematológicas, no parâmetro de contagem total de glóbulos vermelhos, todos os animais já apresentavam anemia antes mesmo da infecção. O grupo experimental *A. caninum* apresentou uma curva de decréscimo de hemácias ao longo da infecção, agravando o estado anêmico dos animais. A análise estatística mostrou haver diferença significativa entre os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum*, sendo este o que provocou menor anemia. Estes resultados foram independentes da diferença do tempo de infecção em cada grupo, uma vez que vários dos parâmetros avaliados foram realizados para os mesmos tempos no curso da infecção, anteriores ao tempo de sacrifício.

Em estudos prévios que avaliaram a história natural da infecção primária em cães com diferentes doses de *Ancylostoma caninum*, os cães apresentaram uma anemia suave e transitória, mesmo com centenas de vermes em seus intestinos (HOTEZ et al., 2002). Já no estudo com diferentes doses de *A. ceylanicum*, um estado anêmico considerável só foi alcançado em infecções com altas doses de larvas, superiores a 12.000 larvas por cão (CARROLL et al., 1984). O que pode sugerir que *A. ceylanicum* é menos adaptado ao parasitismo canino quando comparado com *A. caninum*.

Todos os três grupos permaneceram dentro da faixa de referência durante todo o período de experimentação para o número total de glóbulos brancos. O grupo de *A. caninum* demonstrou um perfil diferente em relação aos outros dois grupos experimentais. Somente este apresentou um aumento no número de leucócitos ao longo da infecção. A análise estatística mostrou haver diferença significativa novamente entre os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum*. Sendo este com o menor número de leucócitos por milímetro cúbico de sangue. No estudo de HOTEZ e colaboradores (2002) também ocorreu

proliferação celular sendo a maior no grupo de animais que receberam 400 larvas de *A. caninum* por animal, superando os valores de referência. Aqui o grupo de *A. caninum* recebeu em média 130 larvas.

O reconhecimento dos anticorpos, avaliados por ELISA, contra os antígenos totais de larva não foram expressivos para os grupos *A. ceylanicum* e *A. braziliense*. Diferente destes, soros do grupo *A. caninum* foi reativo à esses antígenos, no dia do sacrifício, com título de 1:4.500. Os títulos de anticorpos frente aos antígenos totais de vermes adultos foram maiores que os obtidos para os antígenos de larva, exceto para o grupo de *A. ceylanicum* que manteve baixos títulos independente do tipo de antígeno. O grupo *A. caninum* apresentou título (1:1.500) no período de início da patência e terminou com um título ainda maior (1:13.500) no dia do sacrifício. O grupo de *A. braziliense* apresentou título igual ao grupo de *A. caninum* no dia do sacrifício.

O reconhecimento dos anticorpos contra os antígenos ES foi superior se comparado aos antígenos totais, alcançando títulos três vezes maiores. Soros provenientes do grupo infectado por *A. ceylanicum* não apresentaram resposta para os antígenos totais ou para os antígenos ES tanto de larva quanto de verme adulto. Contra os antígenos ES de larva, o grupo *A. braziliense* também não apresentou títulos consideráveis. Já para o grupo *A. caninum*, obteve-se título considerável (1:4.500) apenas para soros obtidos no dia de sacrifício.

Os títulos de anticorpos frente aos antígenos ES de vermes adultos foram maiores que os obtidos para os antígenos ES de larva, sugerindo que, na primoinfecção, o estímulo antigênico do verme adulto seja mais imunogênico do que da larva infectante. O grupo *A. caninum* apresentou títulos altos desde o período de início da patência até o dia de sacrifício (1:40.500). O grupo de *A. braziliense* apresentou título igual ao grupo de *A. caninum* apenas no dia do sacrifício.

Todos os estudos que avaliaram a resposta humoral de cães contra os antígenos de ancilostomídeos encontraram títulos de IgG crescentes e persistentes ao longo da infecção (HOTEZ et al., 2002; CARROLL et al., 1984).

O grupo de *A. caninum* apresentou uma resposta humoral, em títulos de IgG total, mais precoce e mais intensa que os outros dois grupos tanto contra os antígenos totais quanto para os antígenos secretados e excretados. Precoce porque esta já se manifestou durante o período de início de patência e mais

intensa, pois foi o grupo que atingiu os maiores títulos. Além disso, foi o grupo que apresentou aumento do número de células de defesa, o que corrobora para a hipótese de que o cão está mais preparado a enfrentar uma infecção contra o *A. caninum* do que para as demais espécies. Já o *A. ceylanicum* não desencadeou uma resposta imune mensurável do hospedeiro, haja vista os títulos encontrados para os diferentes tipos de antígenos. Um fator que deve ser levado em conta nesse aspecto foi o tempo menor de infecção para este grupo (39 dias). Isso pode ter influenciado uma baixa resposta mesmo no dia do sacrifício, tempo no qual as outras espécies apresentaram maiores títulos. Embora, no tempo de início de patência, que foi igual para as três espécies, os grupos *A. caninum* e *A. braziliense* já apresentavam títulos para alguns antígenos. Outro argumento possível seria a pouca adaptabilidade dessa espécie como parasito de cães. A cepa utilizada vem sendo mantida em hamster e, para esse experimento, foi efetuada uma passagem em cão antes da infecção no grupo experimental. Contudo, essa passagem pode não ter sido suficiente para “acondicionar” o parasito ao novo hospedeiro. Entretanto, o mais intrigante é o fato de que embora a resposta imune e os sinais patológicos no hospedeiro tenham sido de baixa intensidade, a recuperação de vermes para esse grupo, foi bastante semelhante aos outros dois grupos, espécies sabidamente adaptadas à infecção em cães.

Outro fato observado foi que o cão direciona uma maior produção de anticorpos contra os antígenos secretados e excretados pelos vermes do que para os antígenos totais dos mesmos. Isso se justifica, uma vez que são os antígenos ES, nas suas mais diferentes funções, que garantem a manutenção da relação parasitária.

Fica difícil uma extrapolação para essas diferenças encontradas nos resultados deste estudo, tendo em vista que o mesmo difere dos estudos de vacinação, nos quais se pode inferir que os resultados encontrados, como diminuição na eliminação de ovos nas fezes ou de recuperação de vermes adultos do intestino, foram devido a uma resposta imune instalada pelo hospedeiro. É também inadequado afirmar que os resultados encontrados são inerentes às diferentes espécies de ancilostomídeos, uma vez que não foram utilizados como hospedeiros animais da mesma raça, sexo e idade.

Em relação à análise proteômica, tanto os perfis de extratos totais quanto o de produtos secretados e excretados para ambas as fases de larva de terceiro estágio e de verme adulto apresentaram uma grande diversidade de proteínas, de alto a baixo peso molecular. Estes perfis demonstraram haver grande número de proteínas compartilhadas entre as espécies, como também proteínas espécie-específicas, proteínas essas que devem ser melhor investigadas, a medida que o genoma dos ancilostomídeos avançar, uma vez que podem ser a chave para explicar diferenças de comportamento biológico destas espécies frente ao hospedeiro humano. Outros estudos, para diferentes nematodas, avançam neste sentido. Uma análise comparativa do proteoma de produto de secreção e excreção da larva do nematoda do gênero *Trichinella* apresentou proteínas que são diferencialmente expressas entre duas espécies do gênero: *T. pseudospiralis* e *T. spiralis*, que se comportam de forma diferente em seu hospedeiro vertebrado. A primeira existe sob uma forma não encapsulada por colágeno nas células musculares esqueléticas do hospedeiro, enquanto a segunda parasita o hospedeiro protegida por esta cápsula (ROBINSON et al., 2007).

Outra característica é a mudança que ocorre nos perfis protéicos tanto de extratos totais quanto no de produtos ES quando se compara as fases de larva infectante e verme adulto, característica essa já esperada.

Os perfis protéicos de produtos ES tanto de larva quanto de verme adulto se mostraram muito mais divergentes entre as espécies do que os perfis de extratos totais, apresentando um número muito maior de proteínas específicas do que compartilhadas entre as três espécies em estudo. Provavelmente essas diferenças refletem comportamentos biológicos diferentes entre as três espécies. Como exemplo, temos o fato de que a espécie *A. braziliense* produz uma protease, a hialuronidase, importante para penetração da larva através da pele, com uma atividade enzimática superior às enzimas nas outras espécies (HOTEZ et al., 1992). Provavelmente, várias outras moléculas que produzam comportamentos específicos em cada uma das espécies, são refletidas nesse perfil específico.

Ocorreu reconhecimento específico e reação cruzada para os soros dos cães infectados com as três espécies tanto para os antígenos totais de larva

quanto para os de verme adulto, mostrando a similaridade antigênica para essas espécies.

Outro ponto a ser considerado é o aumento da intensidade e do número de bandas reconhecidas pelos soros à medida que aumenta o tempo de exposição ao filme auto-radiográfico, inclusive para o controle negativo, ou seja, cães que nunca tiveram contato com ancilostomídeos. Esse fato demonstra a existência de proteínas semelhantes entre os parasitos e seus hospedeiros, que mesmo não sendo completamente homólogas podem possuir epitopos semelhantes que em diluições menores do soro ou em tempos maiores de exposição podem vir a ser reconhecidas pelo soro pré-imune dos hospedeiros.

Mesmo com reatividade cruzada, os perfis imunogênicos são diferentes entre as espécies para os três *pools* avaliados, tanto contra antígenos totais de larva quanto de verme adulto. Essa característica também foi vista nos perfis imunogênicos de *pool* de soros humanos portadores de gnathostomose frente aos antígenos de helmintos de diferentes famílias como *Ascaris* e *Ancylostoma* (CABALLERO-GARCÍA et al., 2007).

Os perfis imunogênicos para antígenos ES de larva e de verme adulto apresentaram um menor número de bandas reativas do que os perfis com antígenos totais, apesar dos cães apresentarem maiores títulos de IgG total para os antígenos ES. Isso prova que os anticorpos gerados pelo sistema imune do hospedeiro são direcionados para determinados antígenos ES.

Na parte do estudo referente à identificação de proteínas por espectrometria de massa, a maioria das amostras não apresentou homologias significativas quando comparadas aos bancos de dados de proteínas (depositadas e deduzidas do genoma). Vários fatores podem ter contribuído para esse fato. Além de possíveis limitações técnicas, esse fato pode também refletir um conhecimento ainda restrito do genoma de ancilostomídeos.

O genoma da espécie *A. caninum* está em análise por um grupo de pesquisadores que já revelaram algumas características do mesmo, como o tamanho estimado do genoma (347 Mb), seis vezes a mais que o já estimado para outros nematodas relacionados; o número de seqüências transcritas parciais (ESTs) já identificadas (80.551); o número de genes completos (72); o número de seqüências genômicas geradas (104.000); a porcentagem estimada

representada por seqüências gênicas repetitivas (26,9%) e o conteúdo GC do genoma (43,2%) (ABUBUCKER et al., 2008). O número de seqüências de DNA presentes para *A. braziliense* em bancos de dados de DNA é praticamente inexistente (somente 20 seqüências de EST), enquanto que para *A. ceylanicum* existem 10.651 seqüências de EST e 37 seqüências completas de genes. Portanto, o número de seqüências disponíveis é ainda baixo para proporcionar a identificação de novas proteínas. Quando se faz comparação de seqüências de DNA, as homologias são mais facilmente encontradas, pois existe uma certa elasticidade na comparação das seqüências, uma vez que no alinhamento de seqüência podemos formar *gaps*. Entretanto, para a determinação da seqüência peptídica através da espectrometria de massa, a alteração de um único aminoácido mesmo para uma seqüência homóloga pode prejudicar a identificação, pois a análise dos resultados baseia-se em valores de massa dos fragmentos peptídicos (WESTERMEIER et al., 2002).

A medida que novas seqüências gênicas forem depositadas em bancos de seqüências de DNA e de proteínas, as amostras analisadas nesse trabalho poderão ser novamente analisadas nos bancos de dados e mais proteínas poderão ser identificadas.

As cinco proteínas que obtiveram *score* significativo quando analisadas no Mascot foram: a albumina sérica de boi encontrada no produto de excreção e secreção da larva de terceiro estágio de *Ancylostoma braziliense*; a proteína secretada 1 de *Ancylostoma ceylanicum* (ASP-1) encontrada no extrato total de larva de terceiro estágio para a mesma espécie; duas proteínas hipotéticas, uma de *Caenorhabditis elegans* e outra de *Caenorhabditis briggsae* ambas encontradas no extrato total de verme adulto de *A. braziliense* e, por último, a fosfoglicerato quinase de *Enterococcus faecalis* encontrada no produto ES de larva de terceiro estágio de *A. ceylanicum*.

A proteína homóloga à albumina sérica, quando submetida à pesquisa de homologia no programa Mascot apresentou alta similaridade com a proteína de bovino (*score* 334) e com um valor de predição menor para a albumina de cão (*score* 115). A hipótese mais provável para a presença desta proteína do hospedeiro no conteúdo ES de larva de *A. braziliense* é a de um problema técnico, onde o meio RPMI usado estaria suplementado por soro fetal bovino.

Esse erro pode ter ocorrido, uma vez que meio suplementado por soro estava sendo concomitantemente usado no laboratório para outros experimentos que requeriam essa suplementação. Essa hipótese é fortalecida pelo fato de que apenas uma das três espécies apresentou esta proteína em seu perfil protéico e com forte intensidade quando visualizada em géis, mesmo corados por Comassie blue.

Entretanto, proteínas semelhantes à albumina de seus hospedeiros já foram identificadas e localizadas em extratos protéicos totais e em produtos ES de filarídeos como larvas de terceiro estágio de *Wuchereria bancrofti* e em vermes adultos de *Litomosoides chagasfilhoi* (SILVA et al., 2006). A proteína albumina está presente até mesmo em vermes adultos que não possuem hábito de vida parasitário como *Caenorhabditis elegans* (SILVA et al., 2006). O que se conclui desses achados é que essas moléculas não são adquiridas de seus hospedeiros, já que estão presentes nas formas larvares recuperadas dos hospedeiros invertebrados.

Mascarar a superfície do parasito com moléculas derivadas de seus hospedeiros é um dos mais importantes mecanismos de evasão da resposta imune, o que garante a longa permanência destes parasitos em seus hospedeiros (SILVA et al., 2006). Portanto, a presença de moléculas do hospedeiro em extratos protéicos do verme poderia ser explicada nesse contexto.

O esclarecimento desse ponto, se a albumina presente nos produtos ES de *A. braziliense* é oriunda do verme ou estava presente no meio de cultura, só poderia ser realizado através de nova obtenção de produtos ES de larvas dessa espécie. Entretanto, por questões operacionais não mantemos mais essa espécie em nosso laboratório, e sendo a obtenção da espécie de *A. braziliense* bastante laboriosa, uma vez que dificilmente se encontra cães infectados apenas por essa espécie, essa possibilidade não é, no momento, factível. É importante ressaltarmos que, independente do fato dessa proteína se constituir em um contaminante, sua presença não parece ter alterado os resultados sorológicos produzidos. Assim, o resultado do *western blot* não apresentou um maior reconhecimento dessa banda, e do mesmo modo o resultado de ELISA para produtos ES de *A. braziliense* também não apresentou títulos superiores aos de soros direcionados contra *A. caninum*.

A proteína secretada número 1 de *A. ceylanicum* (ASP-1) foi descrita primeiramente em um trabalho de GOUD e colaboradores (2004) como a proteína de secreção e excreção do estágio de larva infectante. A ASP-1 possui 424 aminoácidos, peso molecular de 45,8 kDa e ponto isoelétrico de 6,03. Há dois sítios de glicosilação, nos resíduos 58 e 120. Como outras proteínas ASP, a ASP-1 possui alto conteúdo de resíduos de cisteína (20) com pontes dissulfeto compondo a estrutura secundária. A ASP-1 de *A. ceylanicum* possui identidade de 86% para a ASP-1 de *A. duodenale* e de 85% para as ASP-1 de *A. caninum* e de *Necator americanus*. Existe a seqüência de peptídeo sinal na extremidade N-terminal da proteína.

Esta proteína demonstrou, em ensaios de vacinação em hamsters, provocar alta produção de anticorpos IgG contra ASP-1 com títulos superiores a 1:300.000. Porém, quando estes hamsters foram desafiados, a vacina produzida com a recombinante ASP-1 não elicitou proteção em termos de redução da carga parasitária ou redução do tamanho dos vermes adultos como foi observado pra a vacina recombinante produzida com outra proteína de secreção da larva, a ASP-2 (GOUD et al., 2004). A vacina produzida com a ASP-1 de *A. caninum* mostrou-se eficiente em bloquear a migração da larva em camundongos vacinados e posteriormente desafiados (GHOSH et al., 1996) e de reduzir a carga parasitária em ratos vacinados e posteriormente desafiados (GHOSH et al., 1999) quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

Neste estudo proteínas migrando na mesma posição da proteína ASP-1 de *A. ceylanicum* foram também identificadas nos extratos totais de larva de terceiro estágio para *A. caninum* e *A. braziliense*, sugerindo que essa molécula possa estar também presente nessas outras espécies. Para se ter uma confirmação da identidade das outras bandas identificadas para as outras espécies, se faz necessário o sequenciamento dessas proteínas para as outras espécies, principalmente para a de *A. braziliense* que ainda não possui registro na literatura que possua a proteína ASP-1.

As duas proteínas hipotéticas, uma de *Caenorhabditis elegans* e outra de *Caenorhabditis briggsae*, estão localizadas no cromossomo IV de suas respectivas espécies de origem e possuem homologias com proteínas relacionadas ao metabolismo e ao transporte de aminoácidos (scores 867 e

864 respectivamente). Foi realizada uma busca de homologia (tblastn) a partir da seqüência de aminoácidos para ambas as proteínas hipotéticas contra o banco de dados de seqüências EST de *Ancylostoma* e obteve-se, para ambas, o maior *score* (447) para uma EST da larva infectante de *A. caninum* similar a glutamato desidrogenase de *Haemonchus contortus*, enzima que atua no ciclo da uréia. É claramente compreensível encontrar esta mesma enzima no extrato total de verme adulto como encontrado neste estudo. Homologias encontradas para proteínas do gênero *Caernohabditis* é sempre esperado para espécies de nematódeos, que além de serem filogeneticamente próximos às espécies desse gênero, são espécies que possuem todo o genoma sequenciado, oferecendo um arsenal maior de possibilidades de se encontrar homologias. Neste estudo proteínas migrando na mesma posição das proteínas hipotéticas de *A. braziliense* foram também identificadas nos extratos totais de verme adulto para *A. caninum* e *A. ceylanicum*, sugerindo que essas moléculas possam estar também presentes nessas outras espécies. Para se ter uma confirmação da identidade das outras bandas identificadas para as outras espécies, se faz necessário o sequenciamento dessas proteínas para as outras espécies.

A última proteína identificada foi a fosfoglicerato quinase de *Enterococcus faecalis*, enzima que atua na via glicolítica desta bactéria gram-positiva que habita o trato gastrointestinal do homem e de outros mamíferos, como o cão. A presença desta proteína no conteúdo ES da larva de *A. ceylanicum* pode ser também uma contaminação, uma vez que as larvas são recuperadas da coprocultura de fezes do cão. Entretanto as larvas são lavadas várias vezes, além disso, são tratadas com ácido clorídrico (axenização), para depois serem incubadas no meio de cultura.

Foi realizada uma busca de homologia (tblastn) a partir da seqüência de aminoácidos da proteína bacteriana contra o banco de dados de seqüências EST de *Ancylostoma* e obteve-se o maior *score* (207) para a fosfoglicerato quinase da larva infectante de *A. caninum*.

Além disso, foi feita a análise se havia a presença do peptídeo sinal na seqüência de aminoácido da proteína bacteriana através do SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e não foi encontrado este peptídeo sinal, que é um forte indicativo que a proteína é secretada. Entretanto,

proteínas relacionadas ao metabolismo intracelular sem a presença de peptídeo sinal também já foram identificadas no conteúdo ES de verme adulto de *A. caninum* (MULVENNA et al., 2009).

A sequência de peptídeos identificada na análise pelo espectrômetro de massa para a amostra deste estudo teve maior identificação com a sequência protéica da fosfoglicerato quinase da bactéria do que para a do *A. caninum*, que fortalece a hipótese de contaminação do meio de cultura pela bactéria oriunda da coprocultura.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 1) A eliminação de ovos nas fezes seguiu padrão semelhante para as três espécies, com período pré-patente igual e com diferença significativa entre a *A. ceylanicum* e *A. braziliense*.
- 2) O cão suportou cargas parasitárias semelhantes, uma vez não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a taxa de recuperação de vermes adultos.
- 3) Nas análises hematológicas os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum* se mostraram mais divergentes, sendo o primeiro o causador de maior anemia e de maior proliferação de leucócitos nos animais.
- 4) A resposta humoral caracterizou-se por uma maior produção de anticorpos (IgG total) contra os antígenos de verme adulto, sendo ainda maior para os antígenos ES do mesmo.
- 5) Na resposta humoral os grupos *A. caninum* e *A. ceylanicum* se mostraram mais divergentes, sendo que o primeiro apresentou uma resposta mais precoce e mais intensa e o segundo não respondeu aos diferentes antígenos testados.
- 6) Os perfis protéicos de extratos totais, para ambas as fases, demonstraram maior número de proteínas compartilhadas entre as espécies; entretanto os perfis protéicos de produtos ES apresentaram muito mais proteínas espécie-específicas.
- 7) Os perfis imunogênicos frente aos antígenos totais de larva e verme adulto apresentaram reconhecimento específico e cruzado para os soros dos cães infectados com as três espécies, revelando a similaridade antigênica para essas espécies.
- 8) Mesmo com reatividade cruzada, os perfis imunogênicos contra antígenos totais são diferentes entre as espécies para os três soros avaliados.

9) Os perfis imunogênicos frente aos antígenos ES de larva e verme adulto foram muito menos reativos, apesar dos cães apresentarem maiores títulos de IgG total para tais antígenos, o que prova que os anticorpos gerados são direcionados para determinados antígenos.

10) A identificação de proteínas apresentou, em sua maioria, seqüências peptídicas não significativas quando comparadas aos bancos de dados, o que reflete o grau de conhecimento do genoma para as espécies de ancilostomídeos em estudo.

11) A hipótese mais provável para a presença de albumina do hospedeiro no conteúdo ES de larva de *A. braziliense* é a de contaminação do meio de cultura, já que o maior *score* foi para a albumina de boi.

12) A proteína secretada número 1 de *A. ceylanicum* foi encontrada no perfil de extrato total de larva infectante para *A. ceylanicum* e uma proteína de mesmo tamanho foi também visualizada para as espécies de *A. caninum* e *A. braziliense*, sugerindo que essa proteína esteja presente também nessas espécies.

13) As duas proteínas hipotéticas, uma de *Caenorhabditis elegans* e outra de *Caenorhabditis briggsae*, que possuem homologia para a glutamato desidrogenase foram encontradas no perfil de extrato total de verme adulto de *A. braziliense*. Proteínas de mesmo tamanho foram também visualizadas para as espécies de *A. caninum* e *A. ceylanicum*, sugerindo que essas proteínas estejam presentes também nessas espécies.

14) A hipótese mais provável para a presença da fosfoglicerato quinase no conteúdo ES de larva de *A. ceylanicum* é a de contaminação do meio de cultura, já que houve maior identificação com a sequência protéica da fosfoglicerato quinase da bactéria do que para a do *A. caninum*.

15) Pelos caracteres morfológicos, *A. braziliense* e *A. ceylanicum* estão mais próximos entre si do que o *A. caninum*. Entretanto, na relação com o hospedeiro canino, como na resposta imune desencadeada, *A. caninum* e *A. braziliense* mostraram-se mais próximos do que *A. ceylanicum*.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

A partir da análise dos resultados e conclusões obtidas até o presente momento, foram traçadas algumas perspectivas:

- 1) Realizar a separação dos extratos totais e de produtos ES através da metodologia de eletroforese em gel de duas dimensões a fim de se obter uma separação mais eficiente e uma análise mais apurada das similaridades e diferenças entre as proteínas das 3 espécies;
- 2) Identificar proteínas de interesse por espectrometria de massa dos extratos protéicos corados pelo nitrato de prata uma vez que essa coloração discriminou melhor os diferentes perfis protéicos tanto dos extratos totais quanto dos produtos ES;
- 3) Realizar a contagem diferencial de leucócitos, principalmente a de eosinófilos, para comparar se há diferença na resposta celular para a infecção com as três espécies de ancilostomídeos;
- 4) Dosar outros componentes da resposta imune humoral como outras classes (IgM, IgE) e subclasses (IgG1, IgG2) de imunoglobulinas como também citocinas (IL-10, IL-4) no intuito de caracterizar melhor este tipo de resposta entre os três grupos;
- 5) Utilizar extratos protéicos totais e de produtos ES de *N. americanus* para serem hibridados com os soros dos animais desse estudo com o intuito de discriminar proteínas antigênicas comuns a todas as espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBUCKER, S.; MARTIN, J.; YIN, Y.; JOHNSTON, J. S.; HAWDON, J.; WILSON, R. K.; MITREVA, M; *The canine hookworm genome: analysis and classification of Ancylostoma caninum survey sequences.* **Mol. & Bioch. Parasitol.** v. 157. p. 187-192. 2008.

ALBONICO, M.; SMITH, P.G.; ERCOLE, E. *Rate of reinfection with intestinal nematodes after treatment of children with mebendazole or albendazole in a highly endemic area.* **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.89. p. 538-541. 1995.

ASHTON, P. D.; CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. *Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins.* **Trends in Parasitology.** v.17. p. 198-202. 2001.

ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; HOTEZ, P. J. *X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, Necator americanus, and a vaccine antigen for human hookworm infection.* **J. Mol. Biol.** v. 346. p. 801-814. 2005.

BARÇANTE, J.M.P.; BARÇANTE, T.A.; DIAS, S.R.C.; VIEIRA, L.Q.; LIMA, W.S. & NEGRÃO-CORREA, D.A. *A method to obtain axenic Angiostrongylus vasorum first-stage larvae from dog feces.* **Paras.Res.** v.89. p. 89-93. 2003.

BETHONY, J.; SIMON, G.; PARENTI, D.; SCHUCK, S.; FUJIWARA, R.; HOTEZ, P. J. *Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults.* **Vaccine.** v. 26. p. 2408-2417. 2008.

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

BETHONY, J. *Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals.* **FASEB J.** v. 19. p. 1743-1745. 2005.

BETHONY, J.; CHEN, J.; LIN, S. *Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of Necator infection in Hainan Province, people's Republic of China.* **Clin. Infec. Dis.** v.35. p. 1336-1344. 2002.

BLAXTER, M. L.; DORRIS, M.; DE LEY, P. *Molecular analysis of Nematode diversity and the evolution of parasitism.* **Paras. Today.** v. 15. p. 188-193. 1999.

BOWER, M. A.; CONSTANT, S. L.; MENDEZ, S. *Necator americanus: the Na-ASP-2 protein secreted by the infective larvae induces neutrophil recruitment in vivo and in vitro.* **Experimental Parasitology.** v. 118. p. 569-575. 2008.

BROOKER, S.; BETHONY, J.; RODRIGUES, L. C.; ALEXANDER, N.; GEIGER, S. M.; HOTEZ, P. J. *Epidemiologic, immunologic and practical considerations in developing and evaluating a human hookworm vaccine*. **Expert Rev. Vaccines**. v. 4. p. 35-50. 2005.

BUNGIRO, R.D.; CAPPELLO, M. *Detection of excretory/secretory coproantigens in experimental hookworm infection*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 73. p. 915-920. 2005.

BUNGIRO, R.D.; SOLIS, C.V., HARRISON, L.M. & CAPELLO, M. *Purification and molecular cloning of and immunizations with Ancylostoma ceylanicum excretory-secretory protein 2, an immunoreactive protein produced by adult hookworms*. **Infec. Immun.** v.72. p.2203-2213. 2004.

BUNGIRO, R. D.; HARRISSON, L. M.; CAPPELLO, M. *Ancylostoma ceylanicum excretory/secretory protein 1: purification and molecular cloning of a major secretory protein from adult hookworms*. **Mol. & Bioch. Parasitol.** v. 119. p. 147-151. 2002.

CABALLERO-GARCIA, M. L.; JIMENEZ- CARDOSO, E. *Protein profile analysis from advanced third-stage larvae and adult worms of Gnathostoma binucleatum (Nematoda: Spirurida)*. **Parasitol. Res.** v. 100. p. 555-560. 2007.

CARROLL, S.M.; GROVE, D.I. *Response of dogs to challenge with Ancylostoma ceylanicum during the tenure of a primary hookworm infection*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 80. p. 406-411. 1986.

CARROLL, S.M.; GROVE, D.I. *Parasitological, hematologic and immunologic responses in acute and chronic infections of dogs with Ancylostoma ceylanicum: a model of human hookworm infection*. **J.Infec.Dis.** v. 150. p. 284-294. 1984.

COLES, G. C.; BAUER, F. H.; BORGSTEEDE, S.; WALLER, P. J. *World association for the advancement of veterinary parasitology methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. **Vet Parasitol.**,v. 44. p . 35-44. 1992.

CROMPTON, D. W. *The public health importance of hookworm disease*. **Parasitology**. v. 121. p. 39-50. 2000.

CULLEY, F. J.; BROWN, A.; CONROY, D. M.; SABROE, I.; PRITCHARD, D. I.; WILLIAMS, T. J. *Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo*. **J. Immunol.** v. 165. p. 6447-6453. 2000.

CURY, M. C.; LIMA, W. S. *Helmintos de cães e gatos*. **Cad. Téc. Vet. Zootec.** n. 39. p. 12-35. 2002.

DE SILVA, N.R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D. & SAVIOLI, L. *Soil transmitted helminth infections: updating the global picture*. **Trends Parasit.** v.19. p.547-551. 2003.

FUJIWARA, R. T.; ZHAN, B.; MENDEZ, S.; LOUKAS, A.; BUENO, L. L.; WANG, Y.; PLIESKATT, J.; OKSOV, Y.; LUSTIGMAN, S.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P.; BETHONY, J. M. *Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16*. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 14. p. 281-287. 2007.

FUJIWARA, R. T.; LOUKAS, A.; MENDEZ, S.; WILLIAMSON, A. L.; BUENO, L. L.; WANG, Y.; SAMUEL, A.; ZHAN, B.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M. *Vaccination with irradiated Ancylostoma caninum third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs*. **Vaccine.** v. 26, p.501-509. 2006.

FUJIWARA, R.T.; GEIGER, S.M.; BETHONY, J. & MENDEZ, S. *Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection*. **Parasite Immunol.** v.28. p.285-293. 2006.

FUJIWARA, R.T.; BETHONY, J.; BUENO, L.L.; WANG, Y.; AHN, S.Y.; SAMUEL, A.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P. & MENDEZ, S. *Immunogenicity of the hookworm Na-ASP-2 vaccine candidate*. **Human Vaccine.** v.1. p.123-128. 2005.

GEIGER, S.M.; MASSARA, C.L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P.T. & CORREA-OLIVEIRA, R. *Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil*. **Clin.Exp.Immunol.** v.136. p.334-340. 2004.

GHOSH, K.; WU, W.; ANTOINE, A.D.; BOTTAZZI, M.H.; VALENZUELA, J.G.; HOTEZ, P.J. & MENDEZ, S. *The impact of concurrent and treated Ancylostoma ceylanicum hookworm infections on the immunogenicity of a recombinant hookworm vaccine in hamsters*. **J.Infec.Dis.** v.193. p.155-162. 2006.

GHOSH, K.; HOTEZ, P. J. *Antibody-dependent reductions in mouse hookworm burden after vaccination with Ancylostoma caninum secreted protein 1*. **J. Infect. Dis.** v. 180. p. 1674-1678. 1999.

GHOSH, K.; HAWDON, J. M.; HOTEZ, P. J. *Vaccination with alum-precipitated ASP-1 protects mice against challenge infections with infective hookworm (Ancylostoma caninum) larvae*. **J. Infect. Dis.** v. 174. p. 1380-1383. 1996.

GOUD, G.N.; ZHAN, B.; GHOSH, K. *Cloning, yeast expression, isolation and vaccine testing of recombinant Ancylostoma secreted protein ASP-1 and ASP-2 from Ancylostoma ceylanicum*. **J.Infec.Dis.** v.189. p.919-929. 2004.

HAWDON, J. M.; HOTEZ, P. J. *Hookworm: developmental biology of the infectious process*. **Current Opinion in Genetics and Development**. v. 6. p. 618-623. 1996.

HAWDON, J. M.; JONES, B. F.; HOFFMAN, D.; HOTEZ, P. J. *Cloning and expression of Ancylostoma secreted protein: a polypeptide associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae*. **J. Biological Chem.** v. 271. n. 12. p. 6672-6678. 1996.

HARRISSON, L. M; CORDOVA, J. L.; CAPPELLO, M. *Ancylostoma caninum anticoagulant peptide-5: immunolocalization and in vitro neutralization of a major hookworm anti-thrombotic*. **Mol. Bioch. Parasitol.** v. 115. p. 101-107. 2001.

HEWITSON, J. P.; HARCUS, Y. M.; DOWLE, A. A.; ASHTON, P. D.; MAIZELS, R. M. *The secretome of the filarial parasite, Brugia malayi: proteomic profile of adult excretory-secretory products*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 160. p. 08-21. 2008.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M.E.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; LOUKAS, A. *New technologies for the control of human hookworm infection*. **Trends in Parasitology**. v. 22. p. 327-331. 2006.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M. E.; BROOKER, S.; BUSS, P. *Hookworm: The great infection of mankind*. **PLoS Med.** v. 2. n. 3. p. 187-191. 2005.

HOTEZ, P. J.; BROOKER, S.; BETHONY, J.M.; BOTTAZZI, M.E.; LOUKAS, A. & XIAO, S. *Hookworm infection*. **N. Engl. J. Med.** v.351. p.799-807. 2004.

HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; BETHONY, J.M.; LOUKAS, A. *Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: The Human Hookworm Vaccine Initiative*. **Int. J. Paras.** v.33. p.1245-1258. 2003.

HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; BETHONY, J.M.; SIMMENS, S.; ZOOK, B. C. *Natural history of primary canine hookworm infections after three different oral doses of third-stage infective larvae of Ancylostoma caninum*. **Comp. Parasitol.** v. 69. p. 72-80. 2002.

HOTEZ, P. J.; GHOSH, K.; HAWDON, J. M.; XIAO, S. H.; WANG, H. KOSKI, R. A. *Experimental approaches to the development of a recombinant hookworm vaccine*. **Immunological Rev.** v. 171. p. 163-172. 1999.

HOTEZ, P. J.; HAWDON, J. M.; CAPELLO, M.; GHOSH, K. *Molecular approaches to vaccinating against hookworm disease*. **Pediatr. Res.** v. 40. p. 515-521. 1996.

HOTEZ, P.J. & PRITCHARD, D.I. *Hookworm infection*. **Scientific Am.** v. 272. p. 42-48. 1995.

HOTEZ, P. J.; NARASIMHAN, S.; HAGGERTY, J.; MILSTONE, L.; BHOPALE, V.; SCHAD, G. A.; RICHARDS, F. F. *Hyaluronidase from infective Ancylostoma hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans.* **Infect Immun.** v. 60. p. 1018-1023. 1992.

HOTEZ, P. J.; HAWDON, J.; MILSTONE, L.; GAMBLE, H. R.; RICHARDS, F. *Metalloproteases of infective Ancylostoma hookworms larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis.* **Infection and Immunity.** v. 58. p. 3883-3892. 1990.

ISLAM, M.K.; MIYOSHI, T.; YOKOMIZO, Y.; TSUJI, N. *The proteome expression patterns in adult Ascaris suum under exposure to aerobic/anaerobic environments analyzed by two-dimensional electrophoresis.* **Parasitol. Res.** v. 93. p.96-101. 2004.

KALINKOVICH, A.; WEISMAN, Z.; GREENBERG, Z. *Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection.* **Clin.Exp.Immunol.** v.114. p. 414-421. 1998.

KALKOFEN, U. P. *Hookworms of dogs and cats.* **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** v.17. p. 1341-1354. 1987.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADESKY, K. F.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. *Proteomic analysis of Schistosoma mansoni cercarial secretions.* **Mol. Cell Proteomics.** v. 4. p. 1862-1875. 2005.

LOUKAS, A.; BETHONY, J.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. *Hookworm vaccines: past, present and future.* **The Lancet.** v. 6. p. 733-741. 2006.

LOUKAS, A.; BETHONY, J. M.; MENDEZ, S.; FUJIWARA, R. T.; GOUD, G. N.; RANJIT, N.; ZHAN, B.; JONES, K.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. *Vaccination with Recombinant Aspartic Hemoglobinase Reduces Parasite Load and Blood Loss after Hookworm Infection in Dogs.* **Plos Medicine.** v. 2. n. 10. p. 1008-1017. 2005.

LOUKAS, A.; CONSTANT, S.L. & BETHONT, J. *Immunobiology of hookworm infection.* **FEMS Immun. Med. Microb.** v.43. p.115-124. 2005.

LOUKAS, A.; BETHONY, J. M.; WILLIAMSON, A. L. *Vaccination of dogs with a recombinant cysteine protease from the intestine of canine hookworms diminishes the fecundity and growth of worms.* **J. Infect. Dis.** v. 189. p. 1952-1961. 2004.

LOUKAS, A. & PROCIV, P. *Immune responses in hookworm infections.* **Clin. Microbiol. Rev.** v.14. p. 689-703. 2001.

LOUKAS, A.; DOWD, A. J.; PROCIV, P.; BRINDLEY, P. J. *Purification of a diagnostic, secreted cysteine protease-like protein from the hookworm Ancylostoma caninum.* **Parasito. International.** v. 49. p. 327-333. 2000.

MEEUSEN, E. N.; BALIC, A. *Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites ?* **Parasitol. Today.** v. 16. p. 95-101. 2000.

MENDEZ, S. *Effect of combining the larval antigens Ancylostoma secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by Ancylostoma ceylanicum.* **Vaccine.** v. 23. p. 3123-3130. 2005.

MENDEZ, S.; VALENZUELA, J.G.; WU, W. & HOTEZ, P.J. *Host cytokine production, lymphoproliferation and antibody responses during the course of Ancylostoma ceylanicum infection in the Golden Syrian hamster.* **Inf. Immun.** v.73(6). p.3402-3407. 2005.

MILLER, T.A. *Preparation of a pure culture of Ancylostoma braziliense from a mixed infection of this species and Ancylostoma caninum, by single passage in kittens.* **J. Parasitol.** v. 52. p. 1032-1033. 1966.

MILLER, T.A. *Persistence of immunity following double vaccination of pups with x-irradiated Ancylostoma caninum larvae.* **J. Parasitol.** v. 51. p. 705-711. 1965.

MILLER, T.A. *Influence of age and sex and susceptibility of dogs to primary infection with Ancylostoma caninum.* **J. Parasitol.** v. 51. p. 701-704. 1965.

MILSTONE, A. M.; HARRISON, L. M.; BUNGIRO, R. D.; KUZMIC, P.; CAPELLO, M. *A broad spectrum Kunitz-tupe serine protease inhibitor secreted by the hookworm Ancylostoma ceylanicum.* **J. Biol. Chem.** v. 275. p. 29391-29399. 2000.

MORPHEW, R.M.; WRIGHT, H.A.; LACOURSE, E.J.; WOODS, D.J.; BROPHY, P.M. *Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke Fasciola hepatica in sheep host bile and during in vitro culture ex host.* **Mol. Cell. Proteomics.** v. 6. p. 963-972. 2007.

MOYLE, M.; FOSTER, D.L. *A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18.* **J. Biol. Chem.** v. 269. p. 10008-10015. 1994.

MULVENNA, J.; HAMILTON, B.; NAGARAJ, S.; SMYTH, D.; LOUKAS, A.; GORMAN, J. *Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, Ancylostoma caninum.* **Mol. Cell. Proteomics.** v. 8. p. 109-121. 2009.

OLANTUDE, B.O. & ONYEMELUKWE, C.G. *Immunosuppression in Nigerians with hookworm infection.* **Afr. J. Med. Med. Sci.** v.23. p. 221-225. 1994.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; KATAGIRI, S. *Prevalence of Dog Intestinal Parasites and Risk Perception of Zoonotic Infection by Dog Owners in São Paulo State, Brazil.* **Zoonoses and Public Health.** v. 55. p. 406-413. 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. *Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil.* **Vet Parasitol.**, v. 130, p. 19-27. 2002.

ONYEMELUKWE, C.G. & MUSA, B.O. *T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria.* **Afr.J.Med.Med.Sci.** v.30. p.255-259. 2001.

PALMER, C. S.; TRAUB, R.; ROBERTSON, I. D.; HOBBS, R. P.; ELLIOT, A.; WHILE, L.; REES, R.; THOMPSON, R. C. *The veterinary and public health significance of hookworm in dogs and cats in Australia and the status of A. ceylanicum.* **Vet. Parasitol.** v. 145. p. 304-313. 2007.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.* **Electrophoresis.** v. 20. p. 3551-3567. 1999.

PIT, D.S.; POLDERMAN, A.M.; BAETA, S.; SCHULZ-KEY, H. & SOBOLSLAY, P.T. *Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with Necator americanus and Oesophagostomum bifurcum.* **Paras.Res.** v.87. p. 722-729. 2001.

PROCIV, P. & CROESE, J. *Human eosinophilic enteritis caused by a dog hookworm Ancylostoma caninum.* **Lancet.** v.335. p. 1299-1302. 1990.

QUINNELL, R.J.; PRITCHARD, D.I. *Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection.* **J. Infect Dis.** v. 190. p. 430-438. 2004.

QUINNELL, R.J.; STATER, A.F.; TIGHE, P.; WALSH, E.A.; KEYMER, A.E. & PRITCHARD, D.I. *Reinfection with hookworm after chemotherapy in Papua New Guinea.* **Parasitology.** v. 106. p. 379-385. 1993.

ROBINSON, M.W.; GREIG, R.; BEATTIE, K.A.; LAMONT, D.J.; CONNOLLY, B. *Comparative analysis of the excretory-secretory proteome of the muscle larva of Trichinella pseudospiralis and Trichinella spiralis.* **Inter. J. Parasitol.** v. 37. p. 139-148. 2007.

SILVA, L. F.; BRAYNER, F. A. S.; SANTOS, A. C. O.; LANFREDI, R. M.; PEIXOTO, C. A. *Identification and location of albumin-like antigens in third-stage larva of W. bancrofti, in adults forms of Litomosoides chagasfilhoi and in the free-living nematode Caenorhabditis elegans.* **Micron.** v. 37. p. 666-674. 2006.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.** Bailliere Tindall. Londres. 1982.

TABUSE, Y.; NABETANI, T.; TSUGITA, A. *Proteomic analysis of protein expression profiles during Caenorhabditis elegans development using two-dimensional difference gel electrophoresis*. **Proteomics**. v. 5. p. 2876-2891. 2005.

TAIWO, F. A.; BROPHY, P. M.; PATTERSON, L. H. *Cu/Zn superoxide dismutase in excretory-secretory products of the human hookworm Necator americanus. An electron paramagnetic spectrometry study*. **Eur. J. Biochem**. v. 264. p. 434-438. 1999.

VETTER, J. C.; LEEGWATER, M. E. *Skin penetration of infective hookworm larvae. III. Comparative studies on the path of migration of the hookworms Ancylostoma braziliense, Ancylostoma ceylanicum, and Ancylostoma caninum*. **Z Parasitenkd**. v. 53. p.155-158. 1977.

WEBER, K.; OSBORN, M. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. **J. Biol. Chem**. v. 224. p. 4406-4412. 1969.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim: Wiley-vch verlag-gmbh, 2002.

WILLIAMSON, A. L.; BRINDLEY, P. J.; ABBENANTE, G.; PROCIV, P.; BERRY, C.; GIRDWOOD, K.; PRITCHARD, D. I.; FAIRLIE, D. P.; HOTEZ, P. J.; LOUKAS, A. *Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potencial contribution to host specificity*. **Faseb Journal**. v. 16. p. 1458-1460. 2002.

WILLIAMSON, A. L.; BRINDLEY, P. J.; ABBENANTE, G.; DATU, B. D. J.; PROCIV, P.; BERRY, C.; GIRDWOOD, K.; PRITCHARD, D. I.; FAIRLIE, D. P.; HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; LOUKAS, A. *Hookworm Aspartic Protease, Na-APR-2, Cleaves Human Hemoglobin and Serum Proteins in a Host-Specific Fashion*. **J. Infect. Dis**. v. 187. p. 484-494. 2003.

WILLIAMSON, A. L.; BRINDLEY, P. J.; KNOX, D. P.; HOTEZ, P. J.; LOUKAS, A. *Digestive proteases of blood-feeding nematodes*. **Trends in Parasitology**. v. 19. n. 9. p. 417-424. 2003.

WILLIAMSON, A. L.; LECCHI, P.; TURK, B. E.; CHOE, Y.; HOTEZ, P. J.; MCKERROW, J. H.; CANTLEY, C. L.; SAJID, M.; CRAIK, C. S.; LOUKAS, A. *Multi-enzyme Cascade of Hemoglobin Proteolysis in the Intestine of Blood-feeding Hookworms*. **J. Biol. Chem**. v. 279. n. 34. p. 35950-35957. 2004.

XIAO, S. H.; REN, H. N.; YANG, Y. Q.; FENG, Z. HOTEZ, P. J. *Protective immunity in mice elicited by living infective third-stage hookworm larvae*. **Chinese Medical Journal**. v. 111. p. 43-48. 1998.

YAMAGUTI, S. **Systema Heminthum, Nematoda**. New York. Interscience. 1961.

YATSUDA, A. P.; KRIJGSVELD, J.; HECK, A. J. R.; DE VRIES, E. *Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite Haemonchus contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition.* **J. Biol. Chem.** v. 278. p. 16941-16951. 2003.

ZAHN, B.; LIU, Y.; BADAMCHIAN, M.; WILLIAMSON, A.; FENG, J.; LOUKAS, A.; HAWDON, J. M.; HOTEZ, P. J. *Molecular characterization of the Ancylostoma secreted protein family from the adult stage of Ancylostoma caninum.* **Int. J. Parasitol.** v. 33. p. 897-907. 2003.