

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RENATA BEN BAISCH

**ESTUDO DE PROTEÍNAS DO TUBO REPRODUTOR DE *ANGIOSTRONGYLUS* spp.
PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DAS ANGIOSTRONGILÍASES**

PORTO ALEGRE

2011

RENATA BEN BAISCH

**ESTUDO DE PROTEÍNAS DO TUBO REPRODUTOR DE *ANGIOSTRONGYLUS* spp.
PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DAS ANGIOSTRONGILÍASES**

Tese apresentada como requisito para obtenção de grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

PORTO ALEGRE

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS por toda a ajuda. Em especial ao Rafael, Alessandra e Camila, pois sem a ajuda deles eu não teria conseguido cumprir o prazo para entrega desta tese.

Agradeço a ajuda de todos os momentos da técnica do Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, Priscila, e à técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular do IPB da PUCRS, Silvana, pelo seu empenho em me ajudar na conclusão deste trabalho. Agradeço também ao Juliano, antigo técnico do Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, que muito ajudou no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também aos colegas e aos meus chefes do Instituto Gesta pela compreensão na minha ausência e por disponibilizarem o tempo necessário para a realização dos experimentos deste trabalho.

A professora Ana Cristina Arámburu da Silva pela ajuda, amizade e exemplo sempre.

Ao meu orientador, Carlos Graeff-Teixeira, pelos conhecimentos passados, pelo exemplo, dedicação, motivação e amizade ao longo dos 11 anos em que me orientou. Com certeza foi o maior motivador do meu entusiasmo científico.

Aos meus amigos por terem compreendido os meus momentos de ausência e o meu estresse eventual, mais frequente no final dessa caminhada.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã pela compreensão e incentivo nos momentos de exaustão. Pela oportunidade de ter estudado e pelo esforço que sempre fizeram para que eu pudesse estudar em boas escolas e fazer bons cursos.

Ao meu marido, Diego, pela paciência e compreensão incondicional. Por ter compreendido mesmo sem nada entender, por ter me ajudado, me motivando nos meus momentos de fraqueza, quando parecia que nada ia dar certo. Por ter conseguido, após 11 anos e várias tentativas frustradas, finalmente pronunciar o nome do “bicho” com o qual eu trabalho – *Angiostrongylus*.

A CAPES, pela bolsa concedida e que me possibilitou cursar o PPGBCM.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Vermes do gênero *Angiostrongylus* são parasitos intra-arteriais em roedores. *A. costaricensis* vive no sistema mesentérico, enquanto *A. cantonensis* habita as artérias pulmonares de ratos. No homem, hospedeiro acidental destas parasitoses, elas causam a gastroenterite eosinofílica e meningite devido à migração de adultos jovens de *A. cantonensis* nos tecidos do sistema nervoso central. O exame parasitológico de fezes não pode ser utilizado para diagnóstico humano das angiostrongilíases porque não são encontradas larvas nas fezes, o que torna importante o desenvolvimento de técnicas moleculares. Os métodos de imunodiagnóstico empregando antígenos brutos apresentam reatividade cruzada com outras parasitoses e também resultados falso-negativos. Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico molecular das angiostrongilíases, direcionamos os esforços na tentativa de reduzir a complexidade dos extratos de antígenos a fim de encontrar proteínas mais específicas e sensíveis para o diagnóstico. Primeiramente foi testado o uso de antígenos de *A. cantonensis* para o diagnóstico de *A. costaricensis* pela técnica de ELISA. A partir disso, antígenos de tubo reprodutor (TR) de fêmeas de *A. cantonensis* foram fracionados por diversas técnicas e sua reatividade a soros controle foi testada por Western blot (WB). Colunas de proteína A foram incubadas com soro de pacientes infectados, porém este fracionamento não teve sucesso. Foi realizado o fracionamento subcelular dos extratos TR e com a fração de antígenos de membrana celular (F2) foi realizado o fracionamento por ponto isoelétrico. As frações de pH apresentaram reatividade específica aos soros controle positivos quando submetidas ao WB, sugerindo que as proteínas encontradas possam ser importantes alvos para o diagnóstico das angiostrongilíases. A possibilidade de clonar as proteínas de interesse para produção em grande escala, poderá constituir fonte permanente de antígenos com redução do volume de trabalho e do emprego de animais no laboratório.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*. *Angiostrongylus costaricensis*. Antígeno heterólogo. Cromatografia. Imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Nematode worms in the genus *Angiostrongylus* are intra-arterial parasites of rodents. *A. costaricensis* lives in mesenteric system while *A. cantonensis* inhabits the pulmonary arteries. Man is an accidental host and the worm may cause eosinophilic gastroenteritis or meningitis due to migration of *A. cantonensis*' young adult worms through central nervous system tissues. Molecular methods for diagnosis of human disease are important since parasitological diagnosis is prevented by lack of larval elimination in feces. Immunodiagnostic methods based on crude antigens lack both specificity and sensibility. Efforts were directed towards analysis of fractions for detection of antigens with better performance in immunodiagnosis for the improvement of molecular diagnosis of angiostrongyliasis. The possibility of heterologous antigens was also tested, *A. cantonensis*' proteins being standardized in ELISA for the detection of anti-*A. costaricensis*' antibodies. Analysis of fractions was initiated with the study of proteins extracted from the reproductive tract (RT) from female worms of *A. cantonensis*, several fractionation protocols were tested and protein recognition by sera from infected humans was probed by Western blot (WB). Protein A immunoaffinity columns were loaded with sera from infected patients but recovery of antigens was unsuccessful. The RT extract was fractionated at sub-cellular level and the cellular membrane fraction (F2) was subsequently separated according to isoelectric point intervals. Proteins at several pH intervals were recognized by positive sera in WB. These antigens may be useful as antibody targets for the immunodiagnosis of angiostrongyliasis. Molecular cloning of relevant antigens is a desirable aim for future studies, leading to permanent sources of well-defined antigens and the reduction of the labor intensive in vivo production of these reagents.

Key-words: *Angiostrongylus cantonensis*. *Angiostrongylus costaricensis*. Heterologous antigens. Chromatography. Immunodiagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo evolutivo do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	9
Figura 2 - Aspectos microscópicos de espécimes cirúrgicos humanos	11
Figura 3 - Ciclo do <i>A. cantonensis</i>	13
Figura 4 - Fêmea de <i>A. cantonensis</i> evidenciando o tubo digestivo.....	26
Quadro 1 - Fluxograma do fracionamento dos antígenos de <i>A. cantonensis</i>	27
Quadro 2 - Etapas do <i>Protein A HP Spin Trap</i>	28
Figura 5 - Esquema da montagem do <i>ZOOM® IEF Fractionator</i>	31
Figura 6 - Resultado da purificação com anticorpos utilizando kit <i>Protein A HP Spin Trap</i> ..	33
Figura 7 - Resultado do fracionamento subcelular	33
Figura 8 - Eletroforese bidimensional das frações subcelulares.....	34
Figura 9 - Western blot das frações subcelulares	34
Figura 10 - Resultado do fracionamento por ponto isoelétrico	35
Figura 11 - Western blot das frações de pH testadas com soros humanos individualmente	36
Figura 12 - Western blot da eletroforese bidimensional utilizando as frações de pH.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas descritas para o diagnóstico de <i>A. cantonensis</i>	16
Tabela 2 – Componentes revelados por WB após fracionamento por ponto isoelétrico.....	36

LISTA DE SIGLAS

°C - Graus Celsius
μL - Microlitro
2DE - Eletroforese bidimensional
C - Cutícula
CE - Controle de especificidade
cm - Centímetro
CN - Controle negativo
CP - Controle positivo
DAB - 3,3-Diaminobenzidina tetrahidroclorido
DMP - Dimetil pimelimidato
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DTT - Ditiotreitól
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EUA - Estados Unidos da América
F1 - Fração de proteínas do citosol
F2 - Fração de proteínas de membrana
F3 - Fração de proteínas do núcleo
F4 - Fração de proteínas de citoesqueleto
h - Hora
IEF - Focalização isoeétrica
IgG - Imunoglobulina G
IgG1 - Imunoglobulina G1
kDa - Quilo Dalton
L1 - Larva de primeiro estágio
L3 - Larva de terceiro estágio
LCR - Líquido cefalorraquidiano
M - Marcador de peso molecular
mA - Miliampere
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
mM - Milimolar
ON - Overnigth (16h)
PBS - Tampão fosfato-salino
PBST - Tampão fosfato-salino com Tween 20
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pH - Pontencial de hidrogênio
pI - Ponto isoeétrico
PM - Peso molecular
PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TD - Tubo digestivo
TR - Tubo reprodutor
TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano
UK - Reino Unido
V - Volts
W - Watt
WB - Western blot
xg - Vezes a força da gravidade

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	8
1.1	INTRODUÇÃO	8
1.1.1	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	8
1.1.1.1	O PARASITO	8
1.1.1.2	HOMEM É HOSPEDEIRO ACIDENTAL	10
1.1.1.3	DIAGNÓSTICO	11
1.1.2	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12
1.1.2.1	O PARASITO	12
1.1.2.2	HOMEM É HOSPEDEIRO ACIDENTAL	13
1.1.2.3	DIAGNÓSTICO	14
1.1.3	Busca de antígenos para diagnóstico	17
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	Objetivo Geral	21
1.2.2	Objetivos Específicos	21
2	CAPÍTULO 2	21
2.1	ARTIGO PUBLICADO	21
3	CAPÍTULO 3	26
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1.1	Manutenção do ciclo de <i>A. cantonensis</i>	26
3.1.2	Separação fracionada	26
3.1.3	Cromatografia de imunoafinidade	27
3.1.3.1	EXTRAÇÃO DE ANTÍGENOS	27
3.1.3.2	PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS	27
3.1.4	Extração de antígenos para fracionamento subcelular	29
3.1.4.1	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL	29
3.1.4.2	WESTERN BLOT	30
3.1.4.3	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	30
3.1.5	Fracionamento por ponto isoeletrico	30
3.1.5.1	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL E WESTERN BLOT	31
3.1.5.2	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E WESTERN BLOT	32
3.2	RESULTADOS	32
4	DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	42
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 *Angiostrongylus costaricensis*

1.1.1.1 O PARASITO

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo *A. costaricensis*, um nematódeo intra-arterial próprio de roedores silvestres. A espécie foi descrita na Costa Rica, por Morera & Céspedes (1971) logo após Céspedes *et al.* (1967) descrever, em pacientes da Costa Rica, quadros clínicos com granulomas entéricos e linfáticos com intensa eosinofilia.

Esta parasitose ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, foram descritos casos no Distrito Federal (Barbosa *et al.*, 1980), no Espírito Santo (Pena *et al.*, 1995), em Minas Gerais (Rocha *et al.*, 1991), no sul do estado de São Paulo, no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ziliotto *et al.*, 1975; Ayala, 1982; Agostini *et al.*, 1984). O Rio Grande do Sul, principalmente na sua metade norte, é o estado do Brasil onde foi registrado e diagnosticado o maior número de casos da doença (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a).

O *A. costaricensis* é um nematódeo que vive nas arteríolas mesentéricas da região íleo-cecal de roedores silvestres, tais como *Sigmondon hispidus*, na América Central, e *Oligoryzomys ratticeps* e *Oligoryzomys nigripes*, no sul do Brasil (Graeff-Teixeira *et al.*, 1990). Tem como hospedeiro intermediário, moluscos veronicelídeos como *Sarasinula plebeia* na América Central e norte da América do Sul (Morera *et al.*, 1988) e *Phyllocaulis variegatus* no sul do Brasil (Graeff-Teixeira *et al.*, 1989; Rambo *et al.*, 1997). Outras espécies de moluscos testadas experimentalmente, mostraram-se suscetíveis à infecção (Lima *et al.*, 1992), demonstrando que, espécies como *Biomphalaria glabrata*, podem ser utilizadas para a manutenção do ciclo do parasito em laboratório (Ubelaker *et al.*, 1980).

As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas com as fezes do roedor (Figura 1) e podem penetrar no hospedeiro intermediário por via oral e/ou percutânea (Thiengo, 1996; Mendonça *et al.*, 1999). Nos moluscos, estas larvas chegam ao tecido fibromuscular, evoluem sofrendo duas mudas e originando as larvas de terceiro estágio (L3). As L3, infectantes para os vertebrados, são eliminadas com o muco do molusco e, depois de ingeridas, penetram na

parede do intestino e originam os vermes adultos. Estes são filiformes, apresentando a extremidade anterior arredondada e provida de três pequenos lábios. A fêmea mede em torno de 32 mm de comprimento e o macho 20 mm (Morera, 1973). A fêmea inicia a oviposição a partir do décimo oitavo dia e os ovos são levados pela corrente sanguínea arterial até a parede intestinal, de onde as larvas eclodem e são eliminadas nas fezes.

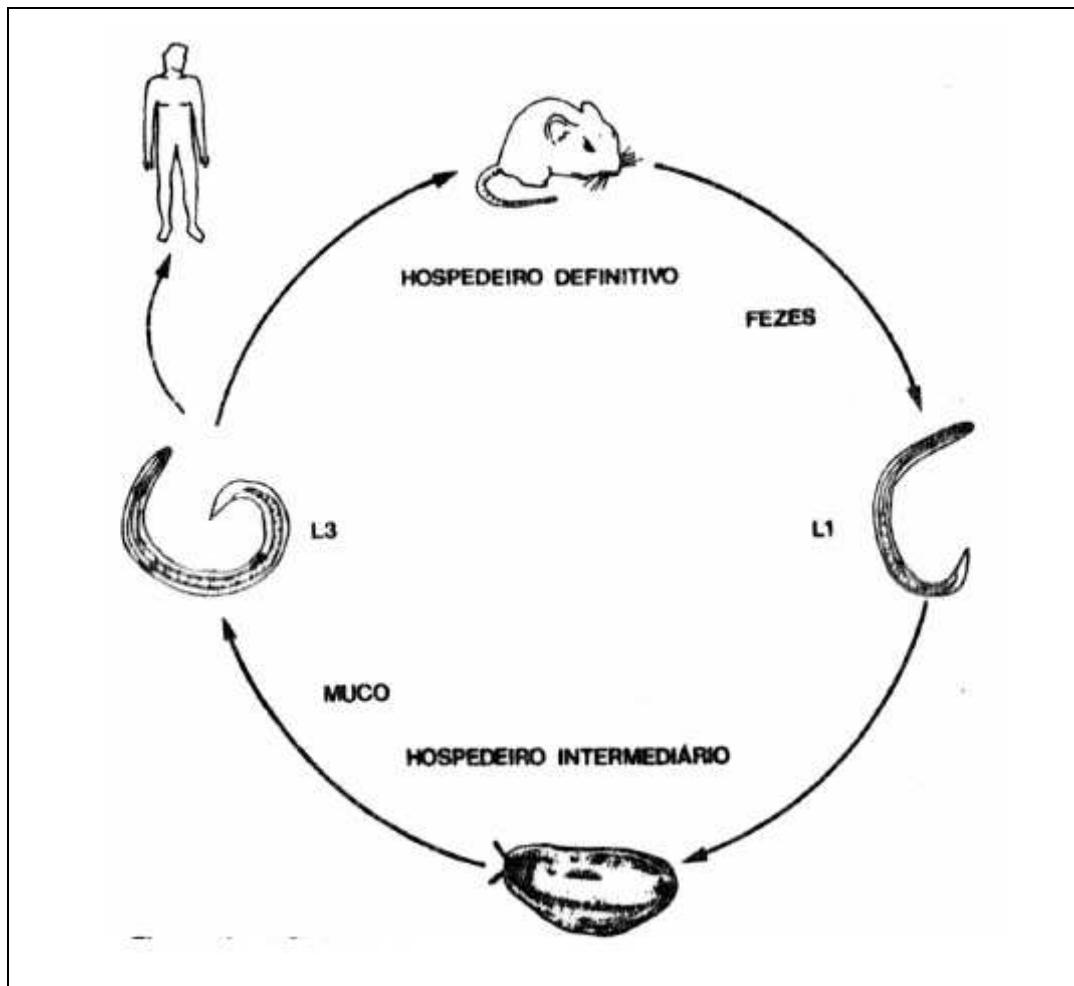


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis*
 Fonte: Rey (2001).

Diferentes estágios do parasito (ovos, L1 e vermes adultos) já foram encontrados em órgãos não mencionados na descrição inicial do ciclo de *A. costaricensis* o que levou Mota & Lenzi (1995) a propor um novo conceito no ciclo de vida deste nematódeo. Foi evidenciada a passagem do parasito do vaso linfático para o arterial através da circulação pulmonar e descritas duas rotas migratórias: (i) linfática-venosa/arterial e (ii) venosa portal. Outro artigo dos mesmos autores (Mota & Lenzi, 2005) confirma a existência dessas duas rotas e enfatiza que a migração pelo fígado seria um evento usual, ao contrário do conceito inicial proposto por Morera *et al.* (1982) onde esse evento é considerado semelhante à larva migrans visceral. Fontoura *et al.* (2007) encontraram L1 em diversos órgãos de modelos experimentais, porém

o número baixo e irregular de larvas recuperadas sugere que a circulação sistêmica seja apenas uma rota alternativa e não a principal via de dispersão do parasito.

1.1.1.2 HOMEM É HOSPEDEIRO ACIDENTAL

O homem é hospedeiro acidental desta parasitose e se infecta pela ingestão de alimentos contaminados com o muco das lesmas contendo larvas infectantes, ou até mesmo ingerindo as lesmas contaminadas. Outras vias de infecção, como intraperitoneal, subcutânea, pele lesada e pele íntegra, foram testadas, confirmando a via oral como sendo a principal na manutenção do ciclo natural desta parasitose (Ubelaker *et al.*, 1981). No homem não ocorre eliminação de L1 nas fezes devido à intensa reação inflamatória da camada muscular da parede intestinal, causada pela presença de ovos e larvas, que ficam retidas no tecido (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991b).

O parasito causa uma doença abdominal de variada gravidade que compromete a região da válvula íleo-cecal, apêndice e intestino delgado (Loria-Cortes & Lobo-Sanahuja, 1980; Graeff-Teixeira, 1986). A doença pode evoluir para a oclusão intestinal com agravamento da dor, distensão abdominal, ruídos hipercinéticos e constipação. A doença parece ser subdiagnosticada devido aos sintomas normalmente inespecíficos como vômito, anorexia, dor abdominal, constipação e ocasionalmente febre (Morera, 1985).

A administração de drogas anti-helmínticas deve ser evitada, pois podem induzir migração errática dos vermes e agravamento das lesões (Morera & Bontempo, 1985). O desconhecimento médico sobre a angiostrongilíase abdominal pode ser perigoso, pelo uso de anti-helmínticos em pacientes apresentando dor abdominal e eosinofilia. A cirurgia é indicada apenas em pacientes com dor abdominal aguda, para resolver o dano intestinal causado por isquemia (Rodriguez *et al.*, 2008). Hidratação, analgesia e nutrição são alternativas de tratamento.

As medidas profiláticas assumem uma grande importância, pois o homem geralmente adquire a infecção pela ingestão de frutas e verduras contaminadas com o muco do molusco infectado. Portanto, lavar as verduras e as mãos após trabalhos de jardinagem e evitar manipular e consumir moluscos são cuidados necessários. Zanini & Graeff-Teixeira (1995), incubando larvas infectantes a 5°C por 12 horas em hipoclorito de sódio 1,5%, solução saturada de cloreto de sódio e vinagre, mostraram que essas substâncias podem ser úteis na descontaminação de alimentos visando à profilaxia da angiostrongilíase abdominal.

1.1.1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo é feito pelo encontro dos vermes, larvas ou ovos em cortes histológicos de biópsias ou peças cirúrgicas (Figura 2). Na ausência destes, o diagnóstico pode ser baseado em três achados histopatológicos fundamentais: (i) infiltração maciça de eosinófilos em todas as camadas da parede intestinal, (ii) reação granulomatosa e (iii) vasculite eosinofílica atingindo artérias, veias, linfáticos e capilares (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991b). Até o momento não existe relato da presença de ovos ou larvas desse nematódeo em exame parasitológico de fezes.

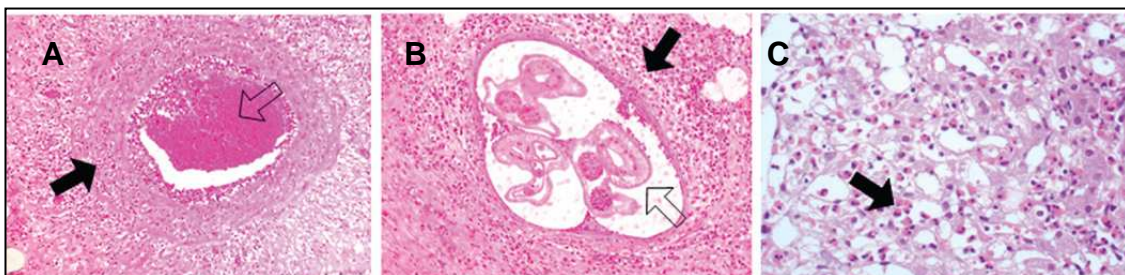


Figura 2 - Aspectos microscópicos de espécimes cirúrgicos humanos. A: Artéria intestinal contendo trombo e evidenciando eosinofilia. B: *A. costaricensis* no lúmen da artéria intestinal e pronunciado infiltrado de eosinófilos. C: Parênquima hepático mostrando infiltrado eosinofílico.

Fonte: Rodriguez *et al.* (2008)

Na Costa Rica é empregado um teste de aglutinação em látex com antígenos totais de vermes adultos, sem ter padronização publicada e no Brasil está disponível um teste de ELISA, com sensibilidade de 86% e especificidade de 83%, para detecção da fase aguda da infecção (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997).

A reação cruzada com outros helmintos e a baixa sensibilidade das técnicas descritas até o momento são os principais problemas. Para minimizá-los, um grande número de antígenos está sendo testado, desde antígenos somáticos até frações purificadas de diferentes extratos, utilizando as técnicas de ELISA, Western blot (WB) e imunofluorescência (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 2001; Bender *et al.*, 2003). Até o momento o teste de Geiger *et al.* (2001) utilizando antígenos somáticos de fêmeas para determinar IgG1 específica foi o que mostrou maior especificidade (91,1%) embora tenha apresentado sensibilidade menor (76,2%).

Silva *et al.* (2003) padronizaram uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a amplificação ocorreu nos três pacientes com diagnóstico confirmado para angiostrongilíase abdominal testados. Não houve amplificação quando utilizado DNA de *Strongyloides ratti*, *Ancylostoma caninum*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*.

1.1.2 *Angiostrongylus cantonensis*

1.1.2.1 O PARASITO

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) é um verme pulmonar de ratos, originalmente descritos em *Rattus norvegicus*, porém outros mamíferos como gatos, macacos e camundongos estão envolvidos na manutenção da parasitose. Este parasito está associado à meningite eosinofílica no homem, e foi recuperado pela primeira vez em Taiwan no ano de 1944, do líquido cérebro espinhal de um homem jovem com sintomas de meningite (Nomura & Lin, 1945). Somente após os anos 60 é que a angiostrongilíase cerebral foi reconhecida como importante problema de saúde.

Infecções humanas já foram descritas na Ásia (Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Hong Kong e Japão), Tahiti, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné e Austrália (Wang *et al.*, 2008). No Brasil, a introdução e disseminação do caracol exótico *Achatina fulica* tem despertado o interesse por métodos diagnósticos para *Angiostrongylus* spp., devido à possibilidade de o molusco ser hospedeiro destes nematódeos. Na metade do ano de 2006 foi comprovado, pela primeira vez na localidade de Cariacica, Espírito Santo, um foco de transmissão ativa do *A. cantonensis* (Caldeira *et al.*, 2007). Recentemente, outro foco foi registrado no Brasil, no estado de Pernambuco (Lima *et al.*, 2009).

O aumento do número de viajantes pelo mundo levou a detecção de importantes casos da doença, tornando importante considerá-la no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas na medicina do viajante (Slom *et al.*, 2002; Leone *et al.*, 2007).

O *A. cantonensis* é um nematódeo heteroxênico capaz de infectar uma variedade de moluscos como hospedeiros intermediários, entre eles, caramujos como *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris*, lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras*. Como hospedeiros definitivos encontramos *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*.

Os vermes são filiformes, a fêmea mede em torno de 22 a 34mm de comprimento e o macho mede de 20 a 25mm de comprimento.

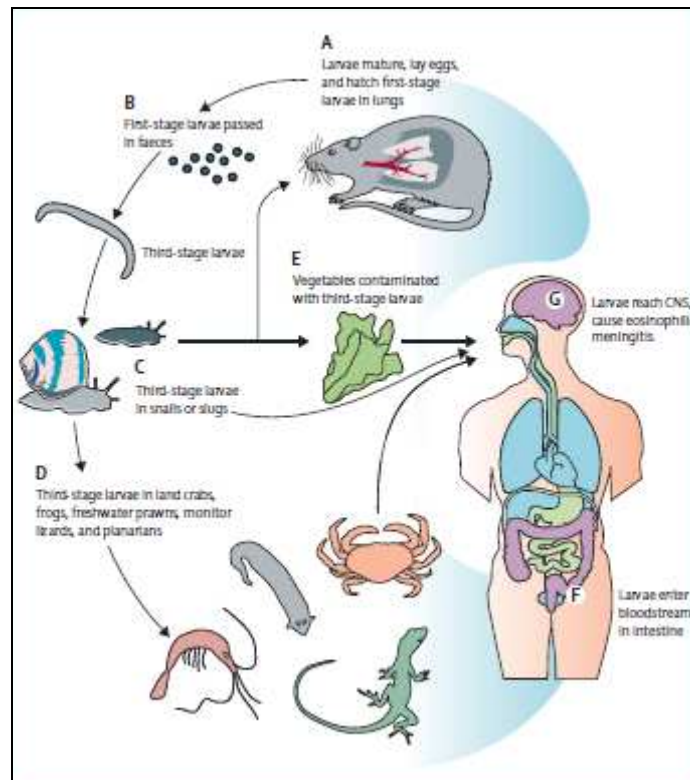


Figura 3 - Ciclo do *A. cantonensis*
 Fonte: Wang et al. (2008).

As L1, que são eliminadas com as fezes dos roedores, evoluem para L3 em muitas espécies de lesmas e caramujos. Quando ingeridas pelo hospedeiro vertebrado as L3 penetram na parede intestinal e migram pela circulação sistêmica. Em dois ou três dias, as larvas, que são neurotrópicas, migram para o cérebro onde crescem e maturam para adultos jovens. Aproximadamente quatro semanas após a penetração inicial das larvas na parede do intestino, os vermes adultos jovens migram para a artéria pulmonar onde produzem ovos que desenvolvem as larvas de primeiro estágio. Estas larvas penetram na cavidade aérea do pulmão, migram para o trato respiratório, são deglutidas e eliminadas com as fezes do hospedeiro.

1.1.2.2 HOMEM É HOSPEDEIRO ACIDENTAL

O homem adquire o nematódeo acidentalmente através da ingestão de alimentos crus contendo as larvas infectantes ou por ingestão dos hospedeiros intermediários. Outra via de infecção não completamente esclarecida é através de água contaminada com as larvas que são liberadas de moluscos mortos. A penetração de larvas presentes no solo através da pele machucada, também é considerada possível via de entrada (Alicata & Brown, 1962).

Em humanos, o parasito não completa o seu ciclo. As larvas migram para o cérebro onde causam abscessos, inchaço cerebral e hemorragia. Os vermes adultos jovens podem andar pela medula espinhal onde eventualmente morrem e degeneram levando a intensa reação inflamatória (Pien & Pien, 1999).

Os sintomas iniciam, em média, em 20 dias após a ingestão das larvas, sendo que o principal deles é a dor de cabeça severa (Kuberski *et al.*, 1979; Tsai *et al.*, 2001), resultado do aumento da pressão intracraniana produzida pela reação inflamatória generalizada nas meninges. Os pacientes podem apresentar também rigidez da nuca, náuseas e vômitos (Kuberski & Wallace 1979; Koo *et al.*, 1988).

A angiostrongilíase é uma doença aguda com resolução espontânea em algumas semanas, raramente deixa sequelas e raramente é fatal, podendo durar de 6 a 34 dias (Tsai *et al.*, 2001). A visão pode ser afetada diretamente pela presença do verme nos olhos ou indiretamente pela paralisia do nervo craniano (Prommindaroj *et al.*, 1962). A patogenia depende diretamente dos danos causados pela movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa do indivíduo infectado.

Segundo estudo conduzido por Hwang & Chen (1991), 51% dos pacientes estudados infectaram-se pela ingestão de caramujos. Outros moluscos e hospedeiros paratênicos como rãs, camarões de água doce, caranguejos, peixes e planarias também podem ser fonte de infecção (Wang *et al.*, 2008). Outra forma menos comum é a ingestão de vegetais contaminados, água e suco de frutas (Slom *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004). Mãos podem levar as larvas diretamente a boca após a manipulação ou brincadeira com moluscos, forma de infecção principal em crianças.

1.1.2.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de *A. cantonensis* é baseado em sintomas clínicos e nos achados laboratoriais. A história de consumo de crustáceos ou moluscos semi-crus e manifestações de meningoencefalites com envolvimento ocular podem ser indícios da parasitose (Eamsobhana, 2006).

A tomografia computadorizada e a ressonância magnética podem revelar a presença de lesões no cérebro e são úteis para o acompanhamento da doença e monitoramento das complicações, mas não servem de base para o diagnóstico diferencial (Kanpittaya *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005). Shih *et al.* (1992) evidenciaram opacidade densa com

margens mal-definidas em radiografia peitoral, provavelmente pela trombose vascular ou reação inflamatória às larvas.

A meningite eosinofílica pode ser indicativa desta parasitose, que geralmente apresenta contagem de eosinófilos no líquido entre 26 e 75%, mas deve ser diferenciada da meningite causada por outros helmintos como *Gnathostoma*, *Paragonimus* e *Taenia solium* (Cross, 1987; Jaroonsesama, 1988). Aproximadamente 2/3 dos pacientes apresentam eosinofilia no sangue periférico e de 15 a 95% apresentam eosinofilia no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Pien & Pien, 1999).

Na busca pelo diagnóstico conclusivo, outras causas de meningite devem ser descartadas, entre elas, as causas alérgicas, infecciosas e malignas. Reações a drogas e material estranho, bem como a doença de Hodgkin e esclerose múltipla são as causas não infecciosas mais comuns (Quinn *et al.*, 1984; Mulligan *et al.*, 1988; Tung *et al.*, 1991), enquanto que as infecções não parasitárias incluem a tuberculose, coxsackie vírus, rickettsia, coccidiomicose e neurosífilis.

O diagnóstico é confirmado com o encontro de larva ou verme adulto no líquido ou na cavidade orbitária do indivíduo infectado. Embora muitos pacientes já tenham sido reportados com essa parasitose, apenas poucos casos tiveram confirmação com encontro do verme no líquido (Eamsobhana, 2006).

O volume de líquido examinado é pequeno, o que dificulta o encontro das formas parasitárias, com isso, os testes sorológicos estão se tornando a alternativa mais apropriada. Nas últimas décadas, vários testes imunológicos utilizando antígenos totais ou parcialmente purificados de larvas, vermes adultos ou produtos de excreção-secreção foram desenvolvidos para dar suporte ao diagnóstico clínico desta angiostrongilíase. O método de ELISA, por ser menos subjetivo e mais sensível do que os outros testes, é o mais empregado em comparações com os novos métodos (Eamsobhana *et al.*, 2009).

Algumas proteínas já foram descritas (Tabela 1) como alvo para o diagnóstico da angiostrongilíase. Nuamtanong (1996) testou o uso de antígeno bruto de fêmea de *A. cantonensis* por ELISA e obteve sensibilidade de 100 % e especificidade de 66,8 %. No mesmo trabalho foi testada a reatividade dos componentes por Western blot. O componente de 29 kDa apresentou sensibilidade de 88,5 % e especificidade de 47,1 %, enquanto que o componente de 31 kDa apresentou menor sensibilidade (69,2 %) e maior especificidade (82,4 %). Eamsobhana *et al.* (1997) também descreveram o componente de 31 kDa como promissor para o diagnóstico de *A. cantonensis*. Essa proteína foi posteriormente purificada através da

eluição de um gel de poliacrilamida e testada por ELISA, apresentando sensibilidade e especificidade de 100 % (Eamsobhana *et al.*, 2001).

Chye *et al.* (2000) purificaram um antígeno de *A. cantonensis* por cromatografia de imunoafinidade utilizando um anticorpo monoclonal específico. Obtiveram uma única banda de 204 kDa que, quando testada por ELISA, apresentou sensibilidade de 91 % e especificidade de 98 % para o soro e sensibilidade de 83 % e especificidade de 100 % para o líquido.

Intapan *et al.* (2003), testaram a resposta das subclasses de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e encontraram melhor resultado de IgG4 ao componente de 29 kDa de verme adulto de *A. cantonensis*, com sensibilidade de 89,2 % e especificidade de 75 %.

Uma versão de dot-ELISA descrita para o diagnóstico experimental em ratos, apresentou sensibilidade de 100 %. Este teste, que utiliza uma fração purificada de 31 kDa parece ser promissor por sua economia e simplicidade, além de estar sendo aplicado com sucesso em trabalhos de campo para diagnóstico da meningite eosinofílica em humanos (Eamsobhana *et al.*, 2003; Eamsobhana, 2006)

Outro estudo utilizando imuno-PCR para detectar antígenos circulantes no soro de pacientes com meningite eosinofílica detectou o componente de 204 kDa com 100 % de especificidade, relatando a técnica como promissora (Chye *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Proteínas descritas para o diagnóstico de *A. cantonensis*.

Antígeno	Método	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Autor
Bruto	ELISA	100	66,8	Nuamtanong, 1996
29 kDa	WB	88,5	47,1	
31 kDa	WB	69,2	82,4	
31 kDa	ELISA	100	100	Eamsobhana <i>et al.</i> , 2001
204 kDa	ELISA (soro)	91	98	Chye <i>et al.</i> , 2000
	ELISA (LCR)	83	100	
29 kDa	ELISA (IgG4)	89,2	75	Intapan <i>et al.</i> , 2003
31 kDa	Dot-ELISA	100	-	Eamsobhana <i>et al.</i> , 2003
204 kDa	Imuno-PCR	100 96,7	100	Chye <i>et al.</i> , 2004

Uma versão de multi-dot foi desenvolvida com antígenos parcialmente purificados para o diagnóstico rápido, simples e diferencial de meningite eosinofílica por infecção por helmintos (*Angiostrongylus cantonensis*, *Gnathostoma spinigerum* e *Taenia solium*), mas apresentou reatividade cruzada entre *A. cantonensis* e *G. spinigerum* (Eamsobhana *et al.*, 2006), necessitando de ajustes.

1.1.3 Busca de antígenos para diagnóstico

Um grande número de antígenos é apresentado para o hospedeiro durante as infecções por helmintos e podem ser classificados em quatro níveis principais: (i) estágio do parasito, (ii) compartimento antigênico (superfície, secreção e somáticos), (iii) componente antigênico e (iv) epítomos antigênicos (Parkhouse & Harrison, 1989). Cada epítomo antigênico apresentado por um parasito ao seu hospedeiro promove uma resposta imunológica diferente em termos de quantidade, isotipo e afinidade dos anticorpos (Parkhouse & Harrison, 1987). A grande variação na resposta a antígenos individuais do nematódeo sugere que um único antígeno não seja suficiente para detectar a infecção devido às variações biológicas (genética, estágio do parasito ou história da infecção) (Parkhouse & Harrison, 1989).

A maioria dos helmintos compartilha as mesmas atividades catabólicas e anabólicas e os componentes necessários para esses processos parecem ser conservados nas espécies. A mistura obtida por centrifugação de um homogeneizado bruto de um organismo está longe de ser um antígeno definido. É bastante provável que os extratos solúveis contenham esses componentes e por isso seu uso resulta em testes instáveis, com reatividade cruzada e, portanto, não específicos.

Os principais alvos para o diagnóstico, desenvolvimento de vacinas e imunomodulação a fim de diminuir o dano patológico são os antígenos de superfície, secreção e somáticos (Parkhouse & Harrison, 1989). Os antígenos de superfície e os secretados pelo parasito são os mais utilizados, pois parecem ser estágio e espécie específicos além de serem mais facilmente apresentados aos hospedeiros. Os antígenos somáticos somente são reconhecidos pelo hospedeiro quando há quebra da superfície do parasito favorecendo a resposta imune aos antígenos internos. Na morte do parasito o hospedeiro é apresentado a uma série de antígenos somáticos, e há sempre um risco de que estes possam provocar reações patológicas.

A utilização de antígeno heterólogo é uma alternativa possível e não deve ser descartada, principalmente na busca de antígenos para diagnóstico de espécies que apresentam difícil manutenção em laboratório e baixa recuperação de parasitos para a produção de antígenos. Dekumyoy *et al.* (2000) utilizaram preparação de antígeno bruto de *A. costaricensis* como alvo para a detecção de anticorpos em pacientes com meningite eosinofílica e obtiveram alta sensibilidade e baixa especificidade. A utilização de espécies congênicas também foi demonstrada no diagnóstico de parasitos que compartilham epítomos como *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides venezuelensis* (Feliciano *et al.*, 2010) ou *Strongyloides ratti* (Rodrigues *et al.*, 2007). Essa abordagem tem se mostrado promissora no desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico de cisticercose, estrogiloidíase e hidatidose (Vaz *et al.*, 1997; Sako *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; da S Ribeiro *et al.*, 2010).

Bender *et al.* (2003), ao utilizarem soros humanos de indivíduos infectados com *A. costaricensis* em técnica de imunofluorescência indireta, observaram fluorescência mais intensa no tubo reprodutor, na superfície dos ovos inteiros e nos fragmentos de L1. Observações em modelos animais também evidenciaram a importância dos ovos na resposta humoral. Em experimento com camundongos, o aumento dos níveis de anticorpos (principalmente IgG e IgG1) coincidiu com a maturidade sexual do parasito e início da oviposição pelas fêmeas (Geiger *et al.*, 1999; Abrahams-Sandí *et al.*, 2004). Outro estudo com antígenos de diferentes estágios de desenvolvimento mostrou que os níveis de anticorpos mais elevados foram encontrados com o emprego de extratos de ovos como antígeno (Abrahams-Sandí *et al.*, 2005). Em estudo com camundongos, as mudanças patológicas ocorrem após a produção e liberação dos ovos, levando a conclusão de que a resposta inflamatória local, o infiltrado celular e a reação granulomatosa induzida pelos ovos e larvas são os principais fatores para a patogênese da infecção por *A. costaricensis* (Geiger *et al.*, 1999).

Mesén-Ramirez *et al.* (2008) utilizaram antígeno de ovo de *A. costaricensis* para o imunodiagnóstico da angiostrongilíase abdominal e encontraram sensibilidade de 90,5% e especificidade de 87%. Foi observada reatividade cruzada com *Strongyloides stercoralis* e os autores sugerem que esta reatividade possa ser resolvida com o emprego concomitante de técnica coproparasitológica, uma vez que, ao contrario do que ocorre em *A. costaricensis*, na estrogiloidíase são eliminadas larvas nas fezes.

A complexidade dos extratos protéicos brutos é um grande desafio na identificação precisa das proteínas. O fracionamento das amostras pode reduzir a complexidade dos antígenos e com isso facilitar a visualização das proteínas e sua análise. Abdolzade-Bavil *et al.* (2004) descreveram um método de extração que permite fracionar de forma simples as

proteínas de acordo com sua localização subcelular, levando a um enriquecimento em proteínas de (i) citosol, (ii) membrana das células e organelas, (iii) solúveis e nuclear associadas ao DNA e (iv) citoesqueleto. Este procedimento está disponível como kit comercial, o *ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit* (Calbiochem, EUA).

Outra técnica capaz de reduzir a complexidade dos extratos é a cromatografia de afinidade, definida como uma técnica de cromatografia líquida que faz uso da interação biológica para a separação de um analito específico na amostra. Exemplos dessa interação incluem ligação de uma enzima a um inibidor ou ligação de um anticorpo a um antígeno. As proteínas A e G são bastante utilizadas como ligadoras de anticorpos. Elas são proteínas da parede celular bacteriana de *Staphylococcus aureus* e grupo G Streptococci, respectivamente. Esses ligantes diferem em sua habilidade de interação com anticorpos de diferentes espécies e classes (Ey *et al.*, 1978; Bjorck & Kronvall, 1984; Akerstrom & Bjorck, 1986). Sua utilização permite purificar antígenos através da ligação a anticorpos específicos previamente fixados a uma matriz de proteína A ou G.

Para separar, analisar e quantificar várias proteínas simultaneamente em uma única amostra podem ser utilizadas técnicas proteômicas. O termo proteoma significa a “análise das PROTEÍNAS expressas pelo genOMA” (Wilkins *et al.*, 1996, Pennington *et al.*, 1997). A eletroforese bidimensional (2DE), introduzida por Klose (1975) e O’Farrell (1985), é o método de escolha por sua habilidade em fazer essa separação. A 2DE separa as proteínas de acordo com duas propriedades independentes: (i) primeira dimensão ou focalização isoeletrica (IEF), que separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) (ponto em que as proteínas atingem a posição estacionária onde possuem carga zero), e (ii) segunda dimensão ou eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que separa as proteínas pelo seu peso molecular (PM). Os pontos (*spot*) resultantes da 2DE correspondem a proteínas na amostra, permitindo, assim, a separação de milhares de proteínas simultaneamente. Alterações no perfil dessas proteínas podem auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnóstico, no entendimento da progressão de doenças, na eficácia de tratamentos, entre outros.

Apesar das grandes vantagens desta técnica, pode ser difícil fazer a análise dos *spots* resultantes principalmente porque as proteínas abundantes acabam mascarando o encontro de proteínas de baixa abundância, que são potenciais biomarcadores. A deleção das proteínas mais abundantes pode ser uma alternativa, devendo ser empregada com cautela, pois durante sua remoção, as proteínas de interesse podem acabar sendo removidas junto.

A resolução inadequada da 2DE para misturas complexas pode ser resolvida com o pré-fracionamento dos extratos em múltiplas faixas de pH (Zuo *et al.*, 2004). Um sistema

disponível comercialmente permite esse fracionamento de forma rápida e simples: o *Zoom IEF Fractionator* (Invitrogen Life Technologies, EUA) auxilia na identificação de um número maior de proteínas, pois além de permitir a separação em pelo menos duas frações de pH (podendo chegar a sete), acaba concentrando as proteínas em cada fração, permitindo inclusive a detecção das proteínas menos abundantes.

Devido à complexidade dos proteomas totais, especialmente de células eucarióticas, é interessante padronizar fracionamentos dos extratos protéicos e criar proteomas parciais. Desta forma a visualização fica mais fácil e a detecção de proteínas menos abundantes se torna possível.

No caso das angiostrongilíases, como não há eliminação de formas parasitárias nas fezes, é importante o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico. O direcionamento dos esforços na tentativa de reduzir a complexidade dos extratos de antígenos pode levar ao encontro de proteínas mais específicas e sensíveis, resultando no aprimoramento do diagnóstico destas parasitoses.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 **Objetivo Geral**

Aprimorar o diagnóstico imunológico das angiostrongilíases.

1.2.2 **Objetivos Específicos**

1 – Testar a utilização de antígenos heterólogos de *A. cantonensis* para o diagnóstico de pacientes infectados com *A. costaricensis*.

2 – Fracionar amostras complexas de antígenos de *A. cantonensis* para a identificação de alvos para o diagnóstico das angiostrongilíases.

3 – Verificar a presença de proteínas reconhecidas por anticorpos de indivíduos infectados com *A. costaricensis*.

2 CAPÍTULO 2

2.1 ARTIGO PUBLICADO

Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay

Renata Ben¹, Rubens Rodrigues², Aventino Alfredo Agostini², Carlos Graeff-Teixeira^{1/+}

¹Grupo de Parasitologia Biomédica, Laboratório de Parasitologia Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Laboratório de Biologia Parasitária, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90690-900 Porto Alegre, RS, Brasil ²Instituto de Patologia de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

Angiostrongylus costaricensis has a broad geographic distribution spanning from North to South America and the infections of vertebrates with this nematode can result in abdominal complications. Human infections are diagnosed by histological or serological methods because the isolation of larvae from feces is not feasible, as most parasites become trapped in intestinal tissues due to intense eosinophilic inflammation. Because *A. costaricensis* is difficult to maintain in the laboratory, an immunodiagnostic IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using antigens from the congeneric *Angiostrongylus cantonensis* species was evaluated against a panel of serum samples from patients who were histologically diagnosed with *A. costaricensis* infections. Sera from uninfected individuals and individuals infected with other parasites were used as controls. The sensitivity and specificity of the assay were estimated at 88.4% and 78.7%, respectively. Because the use of purified or cloned antigens has not been established as a reliable diagnostic tool, the use of heterologous antigens may provide a viable alternative for the development of an ELISA-based immunodetection system for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis.

Key words: abdominal angiostrongyliasis - *Angiostrongylus costaricensis* - *Angiostrongylus cantonensis* - immunodiagnosis - eosinophilic gastroenteritis - helminths

Human abdominal angiostrongyliasis (AA) is caused by infection by the intra-arterial nematode *Angiostrongylus costaricensis* that complete their sexual cycle in rodents. Humans are accidental hosts and the localization of adult worms inside mesenteric arteries leads to the development of inflammatory lesions (Graeff-Teixeira et al. 1991). AA has been diagnosed across Central and South America and isolated imported cases have been reported in Europe and the United States. Molecular diagnostic methods are important for diagnosing human disease because first-stage larvae can only be detected microscopically in the feces of the definitive host, rodents (Pena et al. 1995).

Angiostrongylus cantonensis is a metastrongylid nematode with a broad geographic distribution spanning from Asia, the Pacific Islands, Central America and more recently, South America. Adult worms live within the pulmonary arteries of definitive hosts (e.g. the black rat, *Rattus norvegicus*) following the maturation of late larval stages in the central nervous system. Accidental infections of humans may result in eosinophilic meningitis due to the inability of larvae to exit meningeal tissues (Wang et al. 2008).

The utilization of antigens for the immunodiagnosis of AA has been hindered by complications that are associated with maintaining the life cycle of *A. costaricensis* in

the laboratory for use as a source of crude antigen. However, *A. cantonensis* can be maintained and propagated in the laboratory more effectively and can therefore provide large amounts of heterologous antigens; these antigens can be used to develop immunodiagnostic assays that detect cross-reactive *A. costaricensis* antibodies. This study evaluated the use of *A. cantonensis* antigens in a standardized enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of *A. costaricensis* infections.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

The parasite - A. cantonensis was kindly provided by Professor Kentaro Yoshimura, Akita University Medical School, Japan. The parasite was maintained in the Parasitology Laboratory of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), by perpetuating the infectious cycle in *R. norvegicus* and *Biomphalaria glabrata* that are used as definitive and intermediate hosts, respectively.

Animal handling - Animal experiments were carried out according to regulations that were established by the Brazilian College of Animal Experimentation and the protocol was approved by the University Ethical Committee for research involving human subjects.

Sera - Samples (n = 26) from patients with histopathological diagnoses of *A. costaricensis* infections were used as positive controls (PC) (Graeff-Teixeira et al. 1991). These patients came from the states of RS, Santa Catarina and Paraná and they were diagnosed after surgical treatment for complicated courses of abdominal disease. Serum samples were collected from 1-8 weeks after the beginning of symptoms. A panel of 47 serum samples from patients with positive fecal diagnoses for at least one of the following parasites were included as specificity con-

Financial support: CNPq (grants 300456/2007-7, 477260/2007-1), FAPERGS

CGT is a recipient of a CNPq PQ 1D fellowship.

+ Corresponding author: graeff.teixeira@gmail.com

Received 25 June 2010

Accepted 26 August 2010

trols: *Ascaris lumbricoides*, hookworm, *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis*, *Schistosoma mansoni*, *Strongyloides stercoralis* and *Trichuris trichiura*. These patients lived in the urban areas of Rio de Janeiro, São Paulo or Recife and they were outside of the areas that are endemic for AA. Sera (n = 11) from healthy students (without fever, abdominal pain or any other signs of systemic diseases) from PUCRS were also included as negative controls (NC).

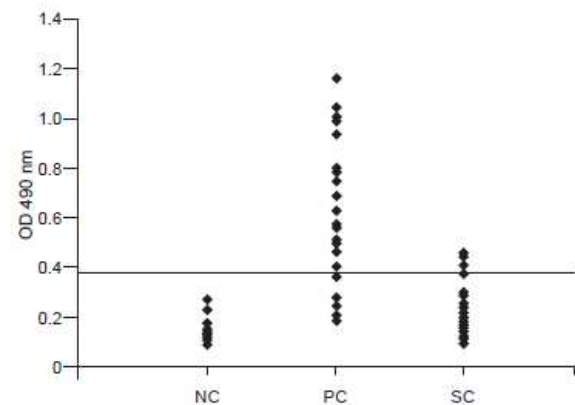
Antigen preparation - Female *A. cantonensis* worms were removed from the pulmonary arteries and cardiac cavities of infected rats, washed in saline and stored at -20°C until use. For antigen preparation, 60 worms were frozen in liquid nitrogen and homogenized until they were reduced to a fine powder. For protein extraction, 1 mL of 20-mM NaCl Tris-HCl containing 1-mM phenylmethylsulphonyl-fluoride (Sigma, St. Louis, MO), 1-mM Na-p-tosyl-L-lysine chloromethylketone TLCK (Sigma) and 1-mM ethylenediamine-tetra-acetic acid EDTA (Sigma) were added and the solution was sonicated three times for 2 min at 30% amplitude. The suspension was centrifuged twice at 12,000 g for 20 min at 4°C and the resulting soluble supernatant was stored at -20°C until use. The protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bradford 1976).

ELISA - The optimal antigen concentrations and serum dilutions for ELISAs were determined by titration and the optimal concentration of crude antigen was determined to be 5 µg/mL. The assays were carried out by coating polystyrene plates with 100 µL of 5-µg/mL antigen in coating buffer (15-mM sodium carbonate and 35-mM sodium bicarbonate, pH 9.6) at 4°C for 12 h overnight. After three washes with phosphate buffered saline (PBS)/0.05% Tween-20, the plates were blocked with 5% non-fat milk in 0.05% Tween-20/PBS solution for 3 h at room temperature (RT). The test sera (1:200) and peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibodies (1:1000, Zymed, USA) were diluted in blocking buffer. The antigen-coated wells were incubated with serum samples and the secondary antibodies were incubated for 2 h at RT. Binding was colorimetrically visualized following the addition of 0.04% o-phenylenediamine (Sigma) tablets that were dissolved in 0.012% H₂O₂/citrate-phosphate buffer (pH 5) for 15 min in the dark at RT. HCl

(2N, 100 µL) was added to the wells to stop the reaction and the optical density (OD) was measured at 490 nm. Cut-off values were calculated as the average OD readings plus two standard deviations.

RESULTS

An *A. cantonensis* crude antigen-based ELISA was developed to diagnose *A. costaricensis* infections. The sensitivity and specificity of the test were determined by comparing OD readings from the sera of *A. costaricensis*-infected patients to the sera of uninfected controls or patients who were infected with different parasites (Table). Twenty-three out of 26 PC sera had positive OD readings compared to 10 out of 47 sera from patients with other parasitic infections, resulting in a sensitivity of 88.4% and a specificity of 78.7% (Figure, Table). When the cut-off values were calculated from NC absorbance readings, the sensitivity and specificity were 76.9% and 93.6% (Table).



Serum reactivity to *Angiostrongylus cantonensis* antigens. IgG reactivity to an *A. cantonensis* crude antigen preparation derived from female worms was assessed using serum from normal negative (NC) (n = 11) individuals, patients (n = 26) with histopathological diagnosis of abdominal angiostrongyliasis (PC) or patients (n = 47) with other parasitic infections (SC). Absorbance values were read at 490 nm. The horizontal bar represents the cut-off value established by SC sera reactivity. OD: optical density.

TABLE
Sensitivity and specificity of an *Angiostrongylus cantonensis* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG anti-*Angiostrongylus costaricensis* antibodies

	Total n	Positive n	Negative n	Sensitivity %	Specificity %
Cut-off: medium optical density + 2 standard deviation ^a of normal control sera					
Positive control	26	20	6	76.9	-
Specificity control	47	3	44	-	93.6
Cut-off: medium optical density + 2 standard deviation of specificity control sera					
Positive control	26	23	3	88.4	-
Specificity control	47	10	37	-	78.7

^a: optical density at 490 nm.

DISCUSSION

A. costaricensis crude antigens have been used for the immunodiagnosis of angiostrongyliasis since 1997 and later in the diagnosis of acute angiostrongyliasis (Graeff-Teixeira et al. 1997, Geiger et al. 2001). Previously used antibody-based detection systems included precipitation reactions (Sauerbrey 1977) and latex agglutination using crude antigenic preparations; the latter has been used for many years in Costa Rica (Kramer et al. 1998). In addition, low molecular weight peptides (Abraham et al. 2004), egg antigens (Mesén-Ramírez et al. 2008) and crude excretion-secretion antigens, as well as host antibody response at both the class (IgE, IgA) and isotype (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (Geiger et al. 2001) levels, have been studied but not extensively evaluated in clinical or epidemiological settings. Due to insufficient sensitivities, specificities and reproducibilities of these assays in diagnosing *A. costaricensis* infections and the unavailability of protocols utilizing purified or recombinant antigens for diagnostic purposes, improvements to currently available crude antigen-based ELISA assays are necessary.

Because *A. cantonensis* and *A. costaricensis* are congeneric, these organisms likely share various antigenic determinants (Dekumyoy et al. 2000). Furthermore, *A. cantonensis* can be easily propagated in the laboratory and can thus provide substantial amounts of crude antigen for use in ELISAs. The feasibility of this congeneric species approach has already been demonstrated by the diagnoses of patients who are infected with parasites that share epitopes, such as *S. stercoralis* and *Strongyloides venezuelensis* (Feliciano et al. 2010) or *Strongyloides ratti* (Rodrigues et al. 2007). This approach has been particularly promising in the development of alternative methods for the diagnoses of cysticercosis, strongyloidiasis and hidatidosis (Vaz et al. 1997, Sako et al. 2006, Feliciano et al. 2010, Oliveira et al. 2010, da S Ribeiro et al. 2010). In addition, Dekumyoy et al. (2000) studied the use of a crude antigen preparation that was derived from *A. costaricensis* as a heterologous target for the detection of antibodies in patients with eosinophilic meningitis.

In addition to a potential use for diagnosis, heterologous antigens may also be useful for vaccination strategies that are based on the elicitation of cross-protective immunity (Stropkova et al. 2010) and the modulation of the immune response (Page et al. 2006). Cross-reactivity or molecular mimicry may elicit the suppression or activation of immune responses that are associated with the pathogenesis of infectious diseases (Kierszenbaum 2003, Gironès et al. 2005, Millington et al. 2006).

The importance of developing molecular diagnostic methods or immunodiagnostic techniques for the diagnosis of human infections with *A. costaricensis* is highlighted by the fact that human cases are difficult to diagnose due to the challenge in identifying trapped larvae (Graeff-Teixeira et al. 1991). For example, a single larva was identified histologically in transit between necrotic intestinal mucosal tissues and the lumen (unpublished observations). More importantly, neither

larvae nor eggs have ever been detected in human stool samples and the examination of feces is not routinely performed in the diagnosis of AA.

Compared to a previous report on ELISA using *A. costaricensis* antigen (Geiger et al. 2001), the ELISA using *A. cantonensis* crude antigen preparation in this study showed increased sensitivity (76% in the previous study vs. 88.4% in this study) and decreased specificity (91.1% in the previous study vs. 78.7% in this study). Purified or cloned antigens have not been established as reliable diagnostic tools. Therefore, the use of heterologous antigens may provide a viable alternative for developing an ELISA-based immunodetection system for use in the diagnosis of AA.

REFERENCES

- Abraham ES, Schulz-Key H, Geiger SM 2004. Caracterización de antígenos de bajo peso molecular de *Angiostrongylus costaricensis*, reconocidos durante una infección experimental en roedores. *Parasitol Latinoam* 59: 8-13.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- da S Ribeiro V, Manhani MN, Costa-Cruz JM 2010. IgA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. *Parasitol Res* 107: 221-225.
- Dekumyoy P, Komalamisra C, Nuamtanong S, Nacapunchai D, Sinawong M, Shanaha P, Piyasattitum P 2000. Angiostrongyliasis: analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31 (Suppl. 1): 48-53.
- Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires M do R, Gonçalves AL, Rodrigues RM, Ueta MT, Costa-Cruz JM 2010. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67: 153-161.
- Geiger SM, Laitano AC, Sievers-Tostes C, Agostini AA, Schulz-Key H, Graeff-Teixeira C 2001. Detection of the acute phase of abdominal angiostrongyliasis with a parasite-specific IgG enzyme linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 515-518.
- Gironès N, Cuervo H, Fresno M 2005. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 296: 89-123.
- Graeff-Teixeira C, Agostini AA, Camillo-Coura L, Ferreira-da-Cruz MF 1997. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop Med Int Health* 2: 254-260.
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL 1991. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77: 606-611.
- Kierszenbaum F 2003. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37: 1-11.
- Kramer MH, Greer GJ, Quiñonez JF, Padilla NR, Hernández B, Arana BA, Lorenzana R, Morera P, Hightower AW, Eberhard ML, Herwaldt BL 1998. First reported outbreak of abdominal angiostrongyliasis. *Clin Infect Dis* 26: 365-372.

- Mesén-Ramírez P, Abrahams-Sandi E, Fernández-Quesada K, Morera P 2008. *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *J Helminthol* 82: 251-254.
- Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM 2006. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol* 5: 5.
- Oliveira HB, Machado GA, Mineo JR, Costa-Cruz JM 2010. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions without affinity to concanavalin A are an important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Clin Vaccine Immunol* 17: 638-644.
- Page KR, Scott AL, Manabe YC 2006. The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe? *Cell Microbiol* 8: 185-196.
- Pena GP, Andrade Filho J, de Assis SC 1995. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 369-374.
- Rodrigues RM, de Oliveira MC, Soplete MC, Silva DA, Campos DM, Taketomi EA, Costa-Cruz JM 2007. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitol Res* 101: 1209-1214.
- Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Ito A 2006. Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and echinococcosis. *Parasitol Int* 55 (Suppl.): 69-73.
- Sauerbrey M 1977. A precipitin test for the diagnosis of human abdominal angiostrongyliasis. *Am J Trop Med Hyg* 26: 1156-1158.
- Stropkovská A, Janulíková J, Varecková E 2010. Trends in development of the influenza vaccine with broader cross-protection. *Acta Virol* 54: 7-19.
- Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira AW 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 354-357.
- Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 8: 621-630.

3 CAPITULO 3

Com o objetivo de fracionar amostras complexas de antígenos de *A. cantonensis* e identificar alvos para o diagnóstico das angiostrongilíases, foram utilizadas as técnicas abaixo descritas:

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 **Manutenção do ciclo de *A. cantonensis***

O ciclo de *A. cantonensis* é mantido no laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS, utilizando-se *B. glabrata* como hospedeiro intermediário e ratos Wistar como hospedeiro definitivo.

3.1.2 **Separação fracionada**

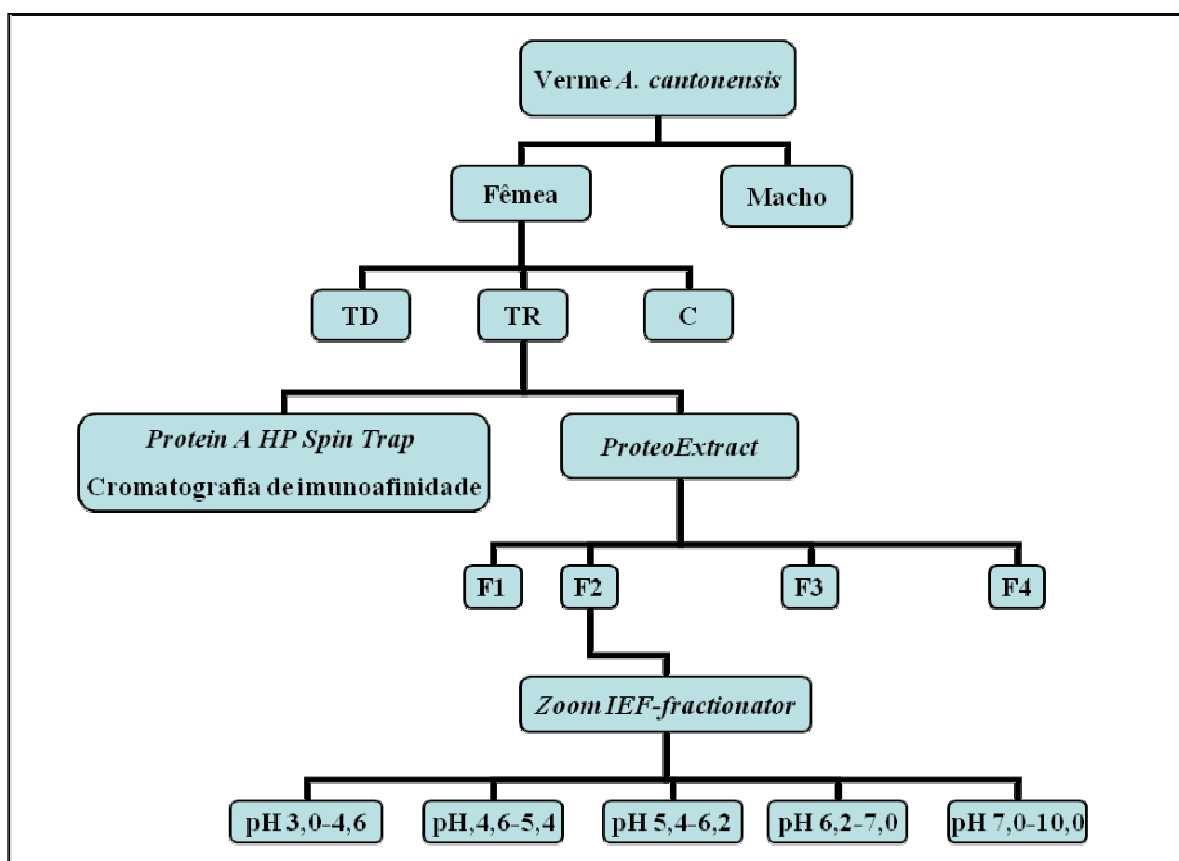
Fêmeas de *A. cantonensis* foram dissecadas com lâminas de bisturi e pinças de ponta fina sob estéreo-microscópio com o auxílio de uma placa de cerâmica refrigerada, para separação do tubo reprodutor (TR) e preservação das proteínas.



Figura 4 - Fêmea de *A. cantonensis* evidenciando o tubo digestivo (porção escura) e o tubo reprodutor (porção mais clara)

Fonte: Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS.

O fracionamento das proteínas foi realizado seguindo o fluxograma do quadro 1.



Quadro 1 - Fluxograma do fracionamento dos antígenos de *A. cantonensis*. TD: tubo digestivo, TR: tubo reprodutor, C: cutícula. F1: proteínas de citosol, F2: proteínas de membrana, F3: proteínas de núcleo, F4: proteínas de citoesqueleto.

3.1.3 Cromatografia de imunoafinidade

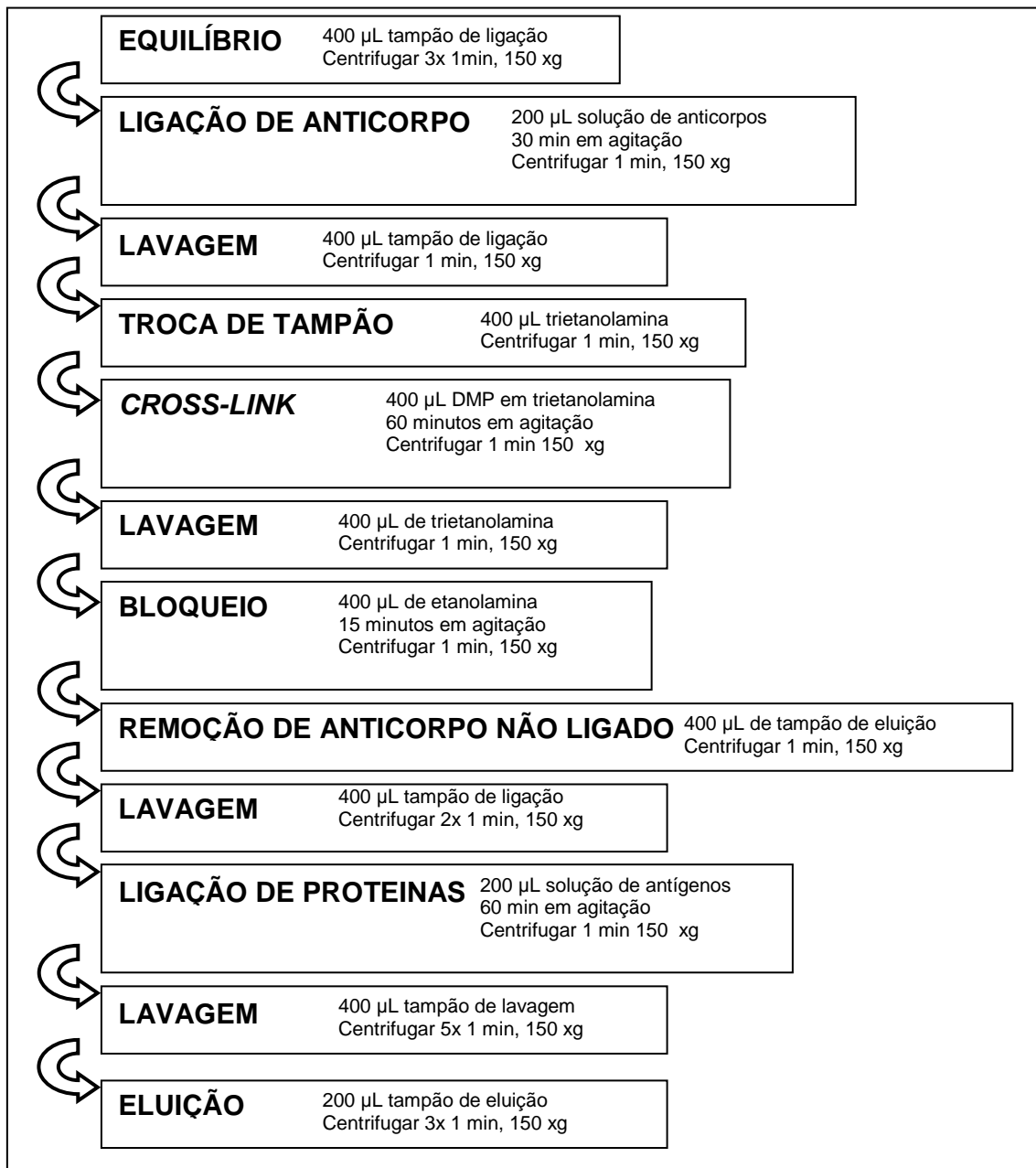
3.1.3.1 EXTRAÇÃO DE ANTÍGENOS

Foram homogeneizados 40 TR de fêmeas de *A. cantonensis* através da ação mecânica de pistilo em resina de extração, com a utilização do *Sample Grinding Kit* (GE, UK). Foram adicionados 300 μ L de TRIS 50 mM pH 7,5 e 8 μ L de coquetel de inibidores de protease (Sigma, EUA). A amostra foi centrifugada 12000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente nas mesmas condições. A concentração protéica foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e a amostra armazenada a -20 °C até o uso.

3.1.3.2 PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Os antígenos foram purificados com cromatografia de afinidade em banho, utilizando-se o kit *Protein A HP Spin Trap* (GE, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado um *pool* de cinco soros de pacientes com diagnóstico confirmado

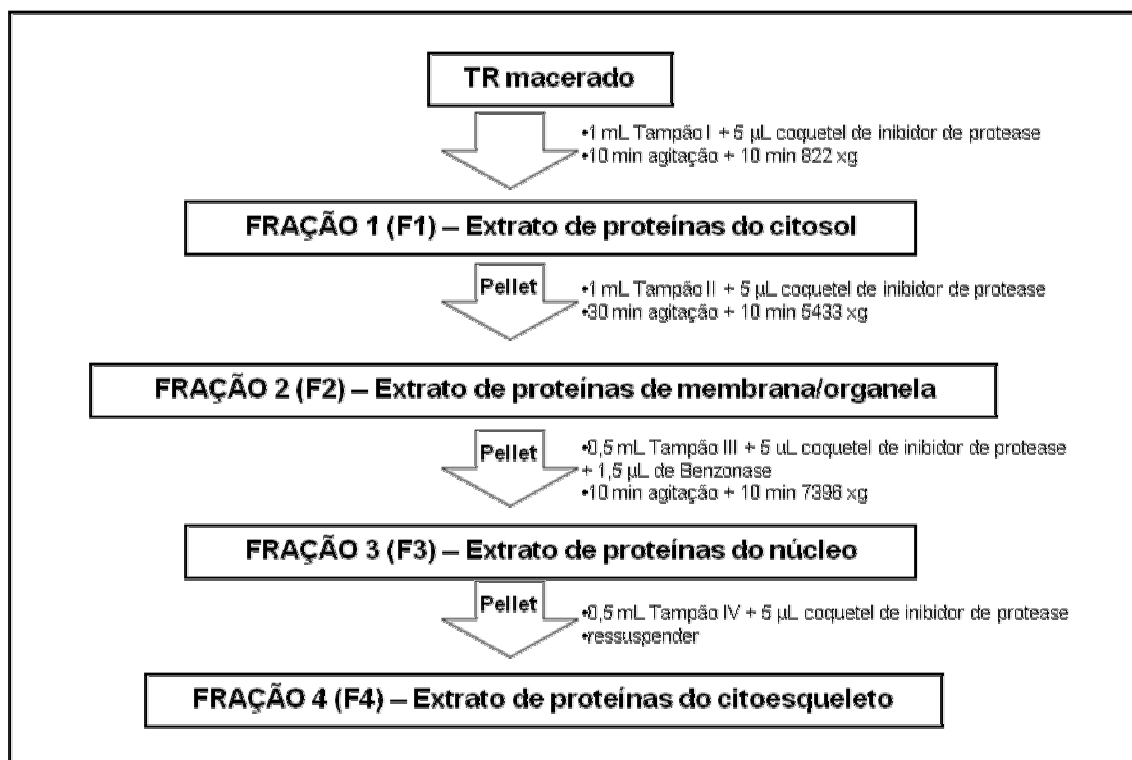
para angiostrongilíase abdominal na etapa de incubação com a matriz de proteína A. Após a lavagem da coluna, a matriz foi incubada com o extrato de antígenos seguida de nova lavagem e eluição. As etapas estão resumidas no quadro 2. As amostras resultantes da purificação foram visualizadas em gel de poliacrilamida 10% corados com azul de Coomassie.



Quadro 2 - Etapas do *Protein A HP Spin Trap*.

3.1.4 Extração de antígenos para fracionamento subcelular

Para a preparação de antígenos para o fracionamento subcelular, TR de 100 fêmeas de *A. cantonensis* foram homogeneizados através da ação mecânica de pistilo em microtubo de plástico, com nitrogênio líquido. Seguiu-se com a utilização do kit comercial *ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction* (Calbiochem, EUA), segundo orientações do fabricante. As etapas estão resumidas no quadro 3.



Quadro 3 - Etapas do kit *ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction*.

Para estimar a concentração protéica foi utilizado o sistema colorimétrico de Bradford.

As frações obtidas foram, então, submetidas à eletroforese uni e bidimensional para visualização das proteínas. Além disso, a reatividade das proteínas foi testada com o Western blot (WB).

3.1.4.1 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

Para a eletroforese unidimensional foi utilizado gel de poliacrilamida 10 % onde foram aplicadas as amostras provenientes do fracionamento subcelular. A corrida foi realizada a 200 V e o gel resultante foi corado com azul de Coomassie.

3.1.4.2 WESTERN BLOT

Para o WB foi utilizado gel de poliacrilamida 10 % onde também foram aplicadas as amostras provenientes do fracionamento subcelular. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham, UK) que, após a transferência, foi dividida em 11 tiras para cada uma das quatro frações (totalizando 44 tiras). As tiras foram bloqueadas por 16 h (ON) com PBS Tween 20 0,05 % (PBST) e leite desnatado 5 % e ao fim deste período foram lavadas 3x por 3 minutos com PBST à temperatura ambiente. Após, foram incubadas por 1 h em agitação a temperatura ambiente seguida de 1 h a 37 °C com o anticorpo primário diluído 1/200 em PBST e leite desnatado 5 %. Em seguida as tiras foram lavadas 3x por 3 minutos com PBST a temperatura ambiente e foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Sigma, EUA) diluído 1/2000 em PBST e leite desnatado 5 %, incubados por 1 h em agitação a temperatura ambiente seguido de 1 h a 37 °C. Após três novas lavagens as tiras foram reveladas com DAB (3,3-Diaminobenzidina tetrahydroclorido – Sigma, EUA).

Como anticorpo primário foi utilizado um soro controle negativo (CN), cinco soros como controle positivo (CP) e cinco soros como controle de especificidade (CE).

3.1.4.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Fitas de 7 cm com gradiente de pH 3-10 imobilizado foram reidratadas ON, com as amostras provenientes do fracionamento subcelular. Na primeira dimensão as proteínas foram separadas por ponto isoelétrico, aplicando-se a seguinte programação: 50 V- 2 mA- 5 W por 30 min; 200 V- 2 mA- 5 W por 1 min; 3500 V- 2 mA- 5 W por 1 h30 min e 3500 V- 2 mA- 5 W por 1 h. Para a segunda dimensão as fitas foram incubadas com tampão de equilíbrio/DTT por 15 minutos e depois com tampão de equilíbrio/iodacetamida por mais 15 minutos. Nesta etapa foi utilizado gel de poliacrilamida 12 % e a separação ocorreu pelo peso molecular. A corrida foi realizada em 200 V. Os géis resultantes da separação bidimensional foram corados com azul de Coomassie para visualização das proteínas.

3.1.5 Fracionamento por ponto isoelétrico

Para realizar o fracionamento por ponto isoelétrico, foi utilizado o sistema *ZOOM*[®] *IEF Fractionator* (Invitrogen, EUA). O sistema foi montado utilizando os filtros de pH 3,0;

4,6; 5,4; 6,2; 7,0 e 10,0 conforme a figura 5. A corrida foi realizada nas seguintes condições: 20 min a 100 V, 1 h 20 min a 200 V e 1 h 20 min a 600 V. A solução de antígenos foi preparada conforme as instruções do fabricante utilizando 2,9 mL de 1,1 x IEF Denaturant Buffer, 35 µL DTT 2 M, 35 µL Focusing Buffer pH 3-7, 35 µL Focusing Buffer pH 7-12, traços de azul de bromofenol e 500 µL da F2 (3,99 mg/mL) proveniente da extração de antígenos. Foram aplicados 650 µL desta solução de antígenos em cada compartimento. Ao final da corrida as amostras foram recolhidas manualmente de cada compartimento e armazenadas individualmente em cada microtubo identificados como segue: pH 3,0-4,6; pH 4,6-5,4; pH 5,4-6,2; pH 6,2-7 e pH 7-10.

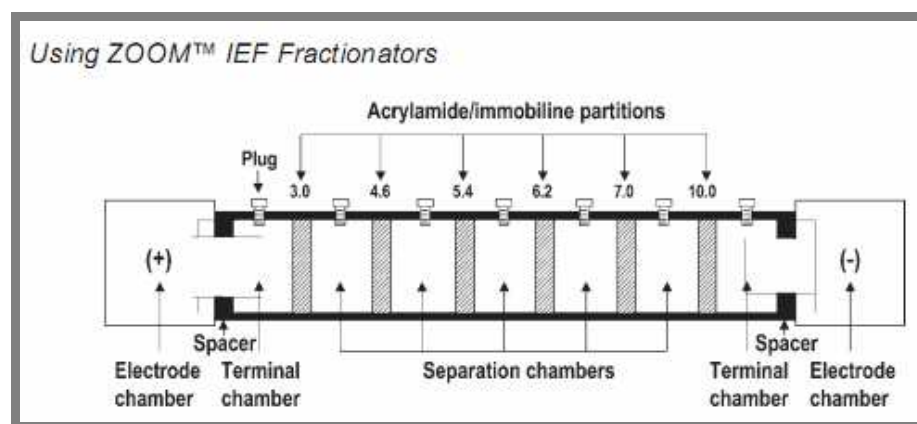


Figura 5 - Esquema da montagem do ZOOM® IEF Fractionator.
Fonte: Manual do equipamento.

3.1.5.1 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL E WESTERN BLOT

Para a eletroforese unidimensional foi utilizado gel de poliacrilamida 10 % onde foram aplicadas as amostras provenientes do fracionamento por pI. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham, UK) e divididas em 15 tiras para cada uma das cinco frações de pH (totalizando 75 tiras). Como anticorpo primário foram utilizados três soros para controle negativo (CN), seis soros como controle positivo (CP) e seis soros como controle de especificidade (CE). O procedimento foi realizado conforme descrito em 3.1.4.2.

Com as distâncias de migração das proteínas do marcador de peso molecular foi construída uma curva padrão para estimar os PM dos componentes identificados.

3.1.5.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E WESTERN BLOT

Fitas de 7 cm com gradiente de pH 3-10 imobilizado foram reidratadas ON, com as amostras provenientes do fracionamento por pI. O procedimento foi realizado conforme descrito em 3.1.4.3. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham) para realização do WB, que foi desenvolvido como descrito em 3.1.4.2.

Como anticorpo primário, utilizamos *pool* de soros de seis indivíduos com diagnóstico confirmado de angiostrongilíase abdominal (CP), *pool* de soros de três indivíduos negativos para este parasito (CN) e *pool* de soros de 6 indivíduos com outras parasitoses (CE).

3.2 RESULTADOS

A utilização de antígeno bruto para o diagnóstico das angiostrongilíases resulta em sistemas para detecção de anticorpos com pouca especificidade. Com base neste problema, o presente trabalho teve por objetivo a busca de antígenos específicos para o diagnóstico desta parasitose. Para isso foram utilizadas técnicas de fracionamento dos extratos brutos a fim de reduzir sua complexidade facilitando, com isso, a análise dos resultados.

O primeiro fracionamento realizado foi anatômico, separando-se a fêmea de *A. cantonensis* em três partes: tubos reprodutores (TR), tubo digestivo (TD) e cutícula (C). Um estudo realizado por Bender *et al.* (2003) evidenciou que o TR e a superfície dos ovos inteiros são as partes do verme de *A. costaricensis* que apresentam maior reatividade ao empregar o método de imunofluorescência indireta. Por essa razão, o TR foi o órgão de escolha no nosso trabalho.

Após o fracionamento anatômico, realizamos a cromatografia de imunoafinidade com o kit *Protein A HP Spin Trap*, adicionando o *pool* de cinco soros humanos de pacientes com diagnóstico confirmado para a angiostrongilíase abdominal. A esse complexo de proteína A/anticorpo adicionamos os antígenos de TR a fim de que apenas as proteínas reconhecidas pelos anticorpos dos pacientes ficassem retidas na cromatografia. Segundo as orientações do fabricante, ao final do procedimento apenas as proteínas seriam eluídas e o anticorpo permaneceria ligado à matriz de proteína A. Porém, não foram obtidos resultados satisfatórios com a cromatografia de imunoafinidade (Figura 6).

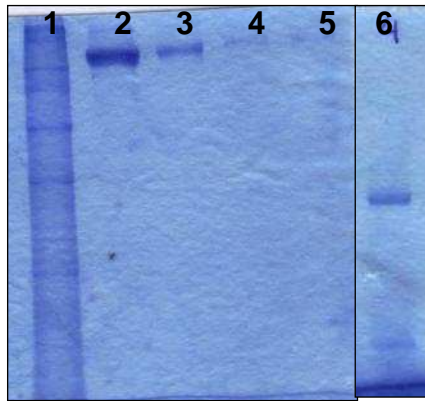


Figura 6 - Resultado da purificação com anticorpos utilizando kit *Protein A HP Spin Trap*. 1: antígeno de TR. 2 a 5: amostras eluídas. 6: amostra 2 tratada com β -mercaptoetanol. Gel de poliacrilamida 10%. Coloração realizada com azul de Coomassie.

Como as dificuldades encontradas na cromatografia de imunoafinidade foram muitas, foram testadas outras formas de fracionamento. Nessa nova etapa o antígeno de TR foi submetido ao fracionamento subcelular (com o kit *ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction*) resultando em quatro frações: fração de proteínas do citosol (F1), fração com proteínas de membrana (F2), fração de proteínas do núcleo (F3) e fração de proteínas de citoesqueleto (F4) (Figura 7 e 8).

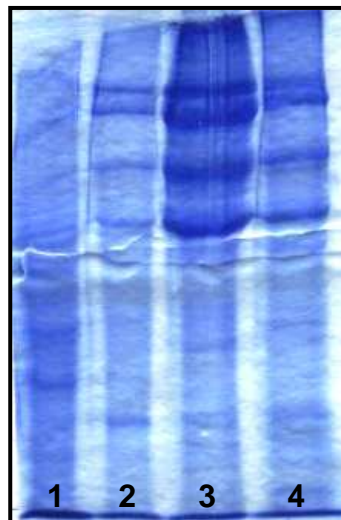


Figura 7 - Resultado do fracionamento subcelular. 1: F1 (proteínas de citosol). 2: F2 (proteínas de membrana celular). 3: F3 (proteínas do núcleo). 4: F4 (proteínas de citoesqueleto). Gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Coomassie.

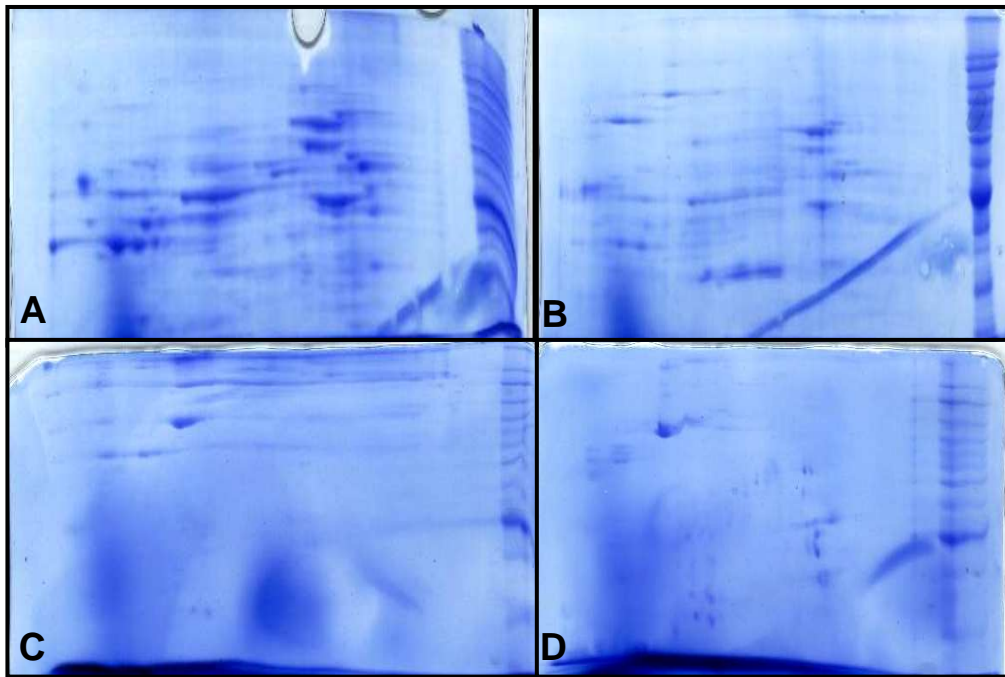


Figura 8 - Eletroforese bidimensional das frações subcelulares. A: F1 (proteínas de citosol), B: F2 (proteínas de membrana celular), C: F3 (proteínas do núcleo), D: F4 (proteínas de citoesqueleto). Gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Coomassie.

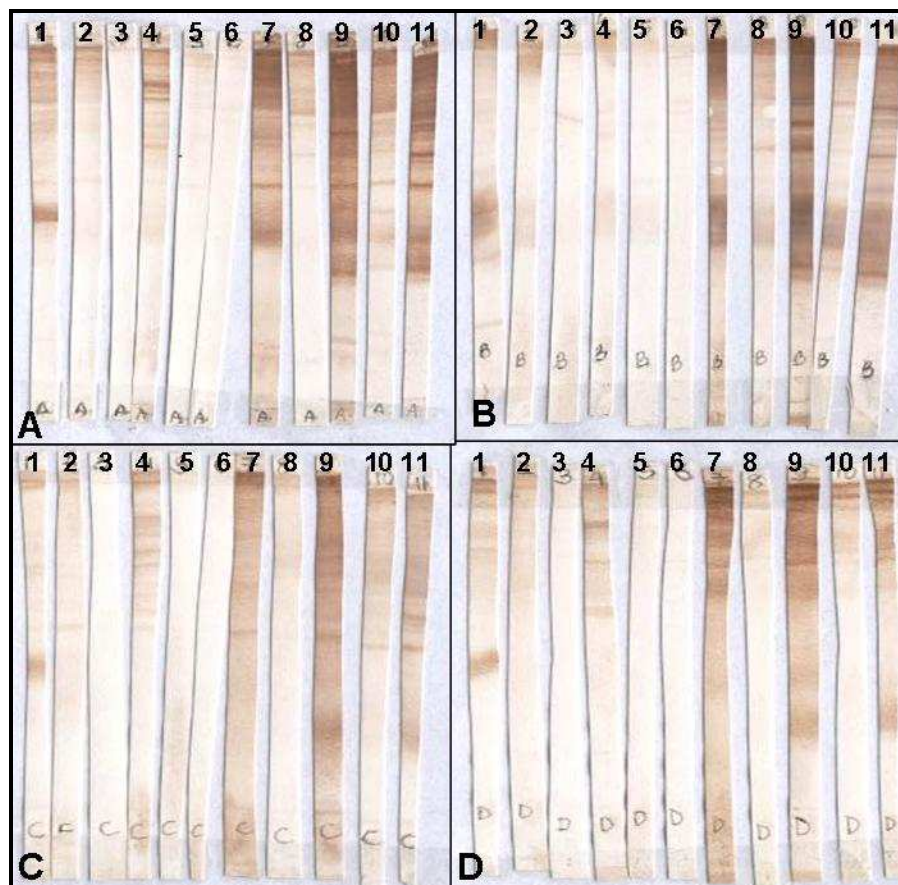


Figura 9 - Western blot das frações subcelulares. A: fração 1, B: fração 2, C: fração 3 e D: fração 4. 1 – controle negativo, 2 a 6 – controle de especificidade, 7 a 11 – controle positivo.

O teste de reconhecimento de componentes das frações através do método de imunoeletrortransferência mostrou que todas as frações apresentaram reatividade tanto para o CN quanto para os CE e CP, sendo que a reatividade mais intensa ocorre com os CP. A F2 foi a que apresentou menor reatividade aos CE (Figura 9).

Os resultados obtidos delinearam a utilização da F2 para as etapas seguintes de fracionamento, já que esta reagiu fortemente com o CP e foi a que apresentou menor reatividade frente ao CE. A partir disso, a F2 foi submetida à focalização isoelétrica para fracionamento em faixas de pH (com o *ZOOM[®] IEF Fractionator*), resultando em 5 frações: pH 3,0 a 4,6; pH 4,6 a 5,4; pH 5,4 a 6,2; pH 6,2 a 7,0 e pH 7,0 a 10 (Figura 10).

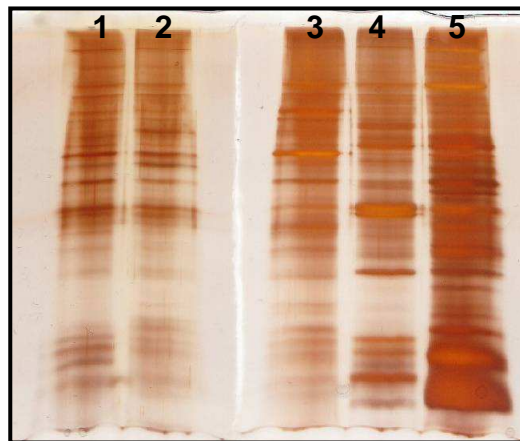


Figura 10 - Resultado do fracionamento por ponto isoelétrico. 1: Fração de pH 3,0 a 4,6. 2: fração de pH 4,6 a 5,4, 3: fração de pH 5,4 a 6,2, 4: fração de pH 6,2 a 7,0, 5: fração de pH 7,0 a 10,0. Gel de poliacrilamida 10% corado pela prata.

Após a visualização das frações em gel de poliacrilamida 10% corado pela prata, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para a realização do WB. Essas frações foram testadas individualmente com os soros controles e o resultado pode ser visualizado na figura 11.

Através da construção de uma curva padrão foram estimados os PM dos componentes revelados, variando de 30 a 150 kDa (Tabela 2). Um componente de aproximadamente 69 kDa foi revelado pelos CP mas também por um CE. Duas bandas, com 52 e 79 kDa, foram reveladas apenas por CE. Se destacam os componentes de 68 e 88 kDa, revelados por todos os CP e apenas por eles.

Finalmente, na tentativa de identificar proteínas específicas para o diagnóstico das angiostrongilíases, as frações de pH foram submetidas a 2DE seguida de WB (figura 12). Este resultado deve ser aperfeiçoado, pois, através dele, será possível eleger as proteínas reconhecidas especificamente pelo soro de pacientes infectados com este nematódeo.

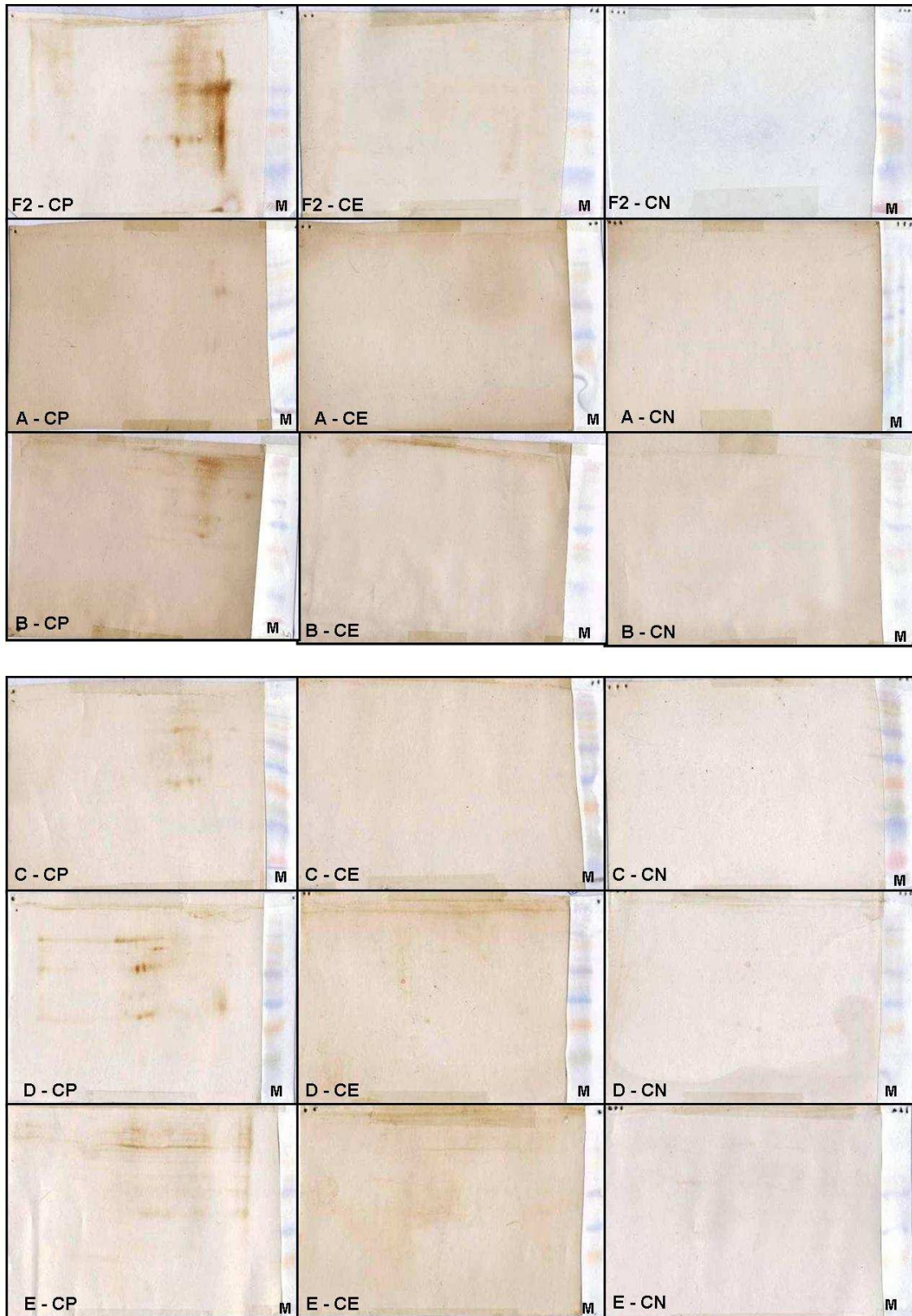


Figura 12 - Western blot da eletroforese bidimensional utilizando as frações de pH. Fitas de pH 3,0-10,0 reidratadas com a F2 (F2) e as frações de pH 3,0-4,6 (A); pH 4,6-5,4 (B); pH 5,4-6,2 (C); pH 6,2 a 7,0 (D) e pH 7,0 a 10,0 (E). CP: controle positivo, CE: controle de especificidade, CN: controle negativo.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas moleculares para o diagnóstico das angiostrongilíases é de grande importância, pois não são encontradas larvas nem ovos nas fezes do homem infectado por esses parasitos. Além disso, os métodos de imunodiagnóstico disponíveis, em geral empregando antígenos brutos, precisam ser aprimorados para melhorar seus desempenhos. Como em qualquer outra infecção, a chave para o diagnóstico específico é o uso de antígenos apropriados. Com antígeno bruto ou apenas parcialmente purificado de vermes adultos, um considerável número de reações falso-positivas com outras parasitoses pode ocorrer (Eamsobhana & Yong, 2009).

A produção de antígenos de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* só é possível atualmente com a manutenção de seu ciclo em laboratório e com todas as dificuldades de manutenção dos hospedeiros vivos e a pressão pela redução do uso de animais. A estratégia de utilizar antígenos heterólogos se justifica pela maior facilidade de obtenção de vermes e larvas de *A. cantonensis*. A padronização obtida contribui para o atendimento da demanda de exames sorológicos para angiostrongilíases no laboratório, garantindo a aplicabilidade destes resultados iniciais, na investigação e manejo dos pacientes. Isto permitiu também a investigação dos primeiros casos autóctones de angiostrongilíase cerebral por *A. cantonensis* no país em Espírito Santo e em Pernambuco (Caldeira *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009).

A complexidade de antígenos brutos dificulta a visualização de proteínas específicas, pois as proteínas mais abundantes podem facilmente mascarar as proteínas de interesse. Além disso, a deleção de certas proteínas na tentativa de facilitar a visualização de proteínas pouco abundantes pode acabar resultando em perda desses potenciais biomarcadores (Silberring & Ciborowski, 2010). Com o auxílio de técnicas de fracionamento podemos separar essa solução complexa de antígenos permitindo a melhor visualização das proteínas. Com base nisso seguiu-se com outras formas de fracionamento dos extratos.

Estudos anteriores com modelos animais apontam o órgão reprodutor e a superfície dos ovos inteiros de *Angiostrongylus costaricensis* como as frações mais imunogênicas (Bender *et al.*, 2003) e associam o aumento na resposta humoral com a maturidade dos vermes e início da oviposição pelas fêmeas (Geiger *et al.*, 1999; Abrahams-Sandí *et al.*, 2004). Por esta razão, o fracionamento anatômico foi a medida inicial adotada pelo presente trabalho, com o uso do TR, a fim de diminuir a complexidade da fonte de antígenos.

O uso da cromatografia de imunoafinidade não apresentou o resultado esperado de sensibilidade a antígenos de *Angiostrongylus*. Segundo as orientações do fabricante, as

proteínas seriam eluídas enquanto os anticorpos permaneceriam ligados à coluna de imunoafinidade. Porém, com a visualização do resultado em gel de poliacrilamida foram reveladas duas bandas de proteínas (figura 6). Interessantemente as massas moleculares das duas bandas correspondem à da cadeia leve e pesada de imunoglobulinas, sugerindo que as imunoglobulinas que deveriam permanecer ligadas acabam sendo eluídas na fase final da cromatografia. Outro problema é que os pacientes podem ter entrado em contato com diversos agentes infecciosos ou alérgicos, especialmente com outros helmintos, e é possível que essas imunoglobulinas não específicas para *A. costaricensis* tenham se ligado a matriz de proteína A. Isso pode ter dificultado a ligação de anticorpos direcionados ao *Angiostrongylus* e prejudicado a purificação das proteínas de interesse. Outra limitação é decorrente da grande quantidade e diversidade de anticorpos presentes no soro policlonal, com a possibilidade de retenção de antígenos em baixa concentração, eventualmente sequer visualizados no eluído. Este efeito de diluição também pode ocorrer quando se utiliza *pool* de soros, onde a grande variabilidade de reatividade existente entre as diferentes amostras pode dificultar a identificação dos anticorpos relevantes para o imunodiagnóstico. A utilização de anticorpos monoclonais poderá ser uma solução para este problema metodológico. Além disso, o volume reduzido de amostra utilizado na técnica também pode ter sido um fator limitante.

O fracionamento subcelular foi testado após os resultados insatisfatórios da cromatografia de imunoafinidade. Apesar de todas as frações subcelulares terem apresentado reatividade para o CN, CE e CP, observou-se maior intensidade no reconhecimento das frações com CP. A reação inespecífica observada em CN e CE por parte de todas as frações, provavelmente ocorreu devido ao número de proteínas nas amostras ainda ser elevado. A F2 foi selecionada para o seguimento da pesquisa por ser constituída de proteínas de membrana, e assim poderia entrar em contato mais facilmente com as moléculas do sistema imune do hospedeiro apresentando um maior potencial no diagnóstico das angiostrongilíases. Efetivamente esta fração apresentou menor reatividade nos testes de CE, sugerindo o potencial uso desta fração nos testes de detecção da doença.

A F2 foi então separada de acordo com intervalos de ponto isoelétrico. Devido à variação biológica do hospedeiro as frações foram testadas individualmente com os soros controles e não mais com *pool* de soros, corrigindo o conjunto de problemas que cerca o uso de soros controles como foi discutido acima. Todas as frações apresentaram padrão similar de reconhecimento de CP e não foram reconhecidas por CN e CE, embora tenha sido observada uma marcação inespecífica nas tiras da amostra 11 e 12 (Figura 11).

Através da construção de curva padrão para a identificação de PM, duas bandas chamam a atenção na fração de pH 3,0-4,6, aproximadamente 68 e 88 kDa. Estas foram reconhecidas por todos os CP e não pelos CN e CE. Além disso, até o momento, não foram citadas em nenhuma publicação, o que pode ser um achado bastante interessante e seu estudo deve ser aprofundado.

Na 2DE foram observados alguns *spots* com reconhecimento específico pelos soros de pacientes com angiostrongilíase abdominal e não por outros soros controles. Através desses resultados será possível eleger algumas proteínas como possíveis alvos para o diagnóstico das doenças. Também será possível realizar análises de caracterização e sequenciamento peptídico através de ferramentas de espectrometria de massas a fim de produzir recombinantes em grande escala.

A possibilidade de clonar as proteínas de interesse para produção em grande escala, poderá constituir fonte permanente de antígenos com redução do volume de trabalho e do emprego de animais no laboratório, além de garantir estudos detalhados e repetidos de validação de sistemas diagnósticos.

Antes da clonagem, muitos estudos ainda precisam ser feitos, com exploração de diferentes alternativas de fracionamentos e purificações. Posteriormente, a identificação das proteínas ou a competente expressão de recombinantes pode demandar grande esforço ainda. A experiência com este trabalho denuncia a ingenuidade de considerar a análise proteômica como panacéia para a identificação de alvos úteis. Ficou demonstrada a necessidade de sucessivos fracionamentos na busca da melhor combinação de etapas, capaz de demonstrar proteínas reconhecidas por anticorpos, que constituam sistemas com melhor desempenho diagnóstico.

5 CONCLUSÕES

Com este trabalho conseguimos padronizar a utilização de antígeno heterólogo para o diagnóstico das angiostrongilíases.

A complexidade dos antígenos brutos é um problema para a visualização de proteínas possivelmente importantes para o diagnóstico das angiostrongilíases. Embora o uso da cromatografia de imunoafinidade com soro policlonal não tenha apresentado resultados satisfatórios, o uso de múltiplos fracionamentos demonstrou bons resultados.

A partir de sucessivos fracionamentos, iniciando pelo fracionamento anatômico, seguido de fracionamento subcelular e finalizando com a separação por ponto isoelétrico, foi possível reduzir a complexidade dos extratos protéicos e identificar antígenos úteis.

As proteínas de 68 e 88 kDa, que apresentam pH entre 3,0 e 4,6, parecem ser promissoras para o diagnóstico das angiostrongilíases e devem ser melhor estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS-SANDÍ, E.; HOFFMANN, W. H.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SCHULZ-KEY, H.; GEIGER, S. M. (2004). **Long-term observations on mouse strains experimentally infected with *Angiostrongylus costaricensis***. *Parasitology Research*, 93: 230–234.

ABRAHAMS-SANDÍ, E.; GEIGER, S. M.; FERNÁNDEZ-QUESADA, K.; SCHULZ-KEY, H. (2005). **Specific antibody production against different life cycle stages during an experimental *A. costaricensis* infection in mice**. *Revista Biomédica*, 16: 239–246.

ABDOLZADE-BAVIL, A.; HAYES, S.; GORETZKI, L.; KRÖGER, M.; ANDERS, J.; HENDRIKS, R. (2004). **Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis**. *Proteomics*, 4: 1397–1405.

AGOSTINI, A. A.; MARCOLAN, A. M.; LISOT, J. M. C.; LISOT, J. U. F. (1984). **Angiostrongilose abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79 (4): 443-445.

AKERSTROM, B.; BJORCK, L. (1986). **A physiochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties**. *J Biol Chem*, 261: 10240–10247.

ALICATA, J. E.; BROWN, R. W. (1962). **Observation on the method of human infection with *Angiostrongylus cantonensis* in Tahiti**. *Canad J Zoo*, 40: 755-760.

AYALA, M. A. R. (1982). **Angiostrongiloidíase Abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 77: 189-193.

BARBOSA, H.; RAICK, A. N.; MAGALHÃES, A. V.; OTERO, P. M. F. (1980). **Angiostrongilose Abdominal**. *Rev Ass Med Bras*, 26: 178-180.

BENDER, A. L.; MAURER, R. L.; SILVA, M. C. da; BEN R.; TERRACIANO, P. B.; SILVA, A. C. da; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2003). **Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensively recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis**. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36 (4): 449-454.

BJORCK, L.; KRONVALL, G. (1984). **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent**. *J Immunol*, 133: 969–74.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.

CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G. F.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. S.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z.; CALDEIRA, O. S. (2007). First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102: 887-889.

CESPEDES, R.; SALAS, J.; MEKBEL, S.; TROPER, L.; MÚLLNER, F.; MORERA, P. (1967). Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). *Acta Méd. Costaric.*, 10 (3): 235-255.

CHEN, H. T. (1935). Un Nouveau Nematode Pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g.n.sp., des Rats de Canton. *Ann. Parasitol*, 13: 312-317.

CHYE, S.; CHANG, J.; YEN, C. (2000). Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kD. *Acta Tropica*, 75: 9-17.

CHYE, S.; LIN, S.; CHEN, Y.; SHUNG, L.; YEN, C. (2004). Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms. *Clinical Chemistry*, 50 (1): 51-57.

CROSS, J. H. (1987). Public health importance of *Angiostrongylus cantonensis* and its relatives. *Parasitol. Today*, 3: 367-369.

da S RIBEIRO, V.; MANHANI, M. N.; COSTA-CRUZ, J. M. (2010). IGA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. *Parasitol Res*, 107: 221-225.

DEKUMYOY, P.; KOMALAMISRA, C.; NUAMTANONG, S.; NACAPUNCHAI, D.; SINNAWONG, M.; SHANAHA, P.; PIYASATITTAM, P. (2000). Angiostrongyliasis: analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 31(1): 48-53.

EAMSOBHANA, P. (2006). The rat lungworm *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis*: parasitology, immunology, eosinophilic meningitis, epidemiology and laboratory diagnosis. Bangkok, Wankaew (IQ) Book Center Co Ltd.

EAMSOBHANA, P.; YONG, H. S. (2009). **Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae).** *International Journal of Infectious Diseases*, 13: 425-431.

EAMSOBHANA, P.; MAK, J. W.; YONG, H. S. (1997). **Identification of *Parastrongylus cantonensis* specific antigens for use in immunodiagnosis.** *Int Med Res J*, 1: 1-5.

EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; SUVOUTTHO, S.; SUVOUTTHO, S. (2001). **Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-PAGE polyacrylamide gels.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32 (2): 308-313.

EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; KREETHAPON, N. (2003). **Blinded multi-laboratory evaluation of an in-house dot-blot ELISA kit for diagnosing human parastrongyliasis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34: 1-6.

EAMSOBHANA, P.; ONGROTCHANAKUN, J.; YOOLEK, A.; PUNTHUPRAPASA, P.; MONKONG, N.; DEKUMYOY, P. (2006). **Multi-immunoblot for rapid differential diagnosis of eosinophilic meningitis due to parasitic infections.** *J Helminthol*, 80: 249-254.

EY, P. L.; PROWSE, S. J.; JENKIN, C. R. (1978). **Isolation of pure IgG, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose.** *Immunochemistry*, 15:429-36.

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. do R.; GONÇALVES, A. L.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. (2010). **Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67(2): 153-161.

FONTOURA, G. D. R.; MAURER, R. L.; OLIVEIRA, C. M.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2007). **Abdominal angiostrongyliasis in rodent experimental infection: Evidence for systemic circulation of first stage larvae.** *Parasitology International*, 56: 227-229.

GEIGER, S. M.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SOBOSLAY, P. T.; SCHULZ-KEY, H. (1999). **Experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection in mice: immunoglobulin isotype responses and parasite-specific antigen recognition after primary low dose infection.** *Parasitology Research*, 85: 200-205.

GEIGER, S. M.; LAITANO, A. C.; SIEVERS-TOSTES, C.; AGOSTINI, A. A.; SCHULZ-KEY, H.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2001). **Detection of the acute phase of abdominal angiostrongyliasis with a parasite-specific IgG enzyme linked immunosorbent assay.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 515-518.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. (1986). **Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil.** Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 137p.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOMÉ, J. W.; PINTO, S. C. C.; CAMILLO-COURA L.; LENZI, H. L. (1989). ***Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil.** *Mem Ins. Oswaldo Cruz*, 84: 65-68.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AVILA-PIRES, F. D.; MACHADO, R. C. C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. (1990). **Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil.** *Revista do Inst Med Trop*, 32: 147-150.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. (1991a). **Angiostrongilíase abdominal – Nova Parasitose no Sul do Brasil.** *Rev AMRIGS*, 35 (2): 91-98.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. (1991b). **Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis.** *Parasit Res*, 77: 606-611.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AGOSTINI, A. A.; CAMILLO-COURA, L.; FERREIRA DA CRUZ, F. (1997). **Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil.** *Trop Med Int Health*, 2 (3): 254-260.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A. C. A. da; YOSHIMURA, K. (2009). **Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance.** *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2): 322-348.

HWANG, K. P.; CHEN E. R. (1991). **Clinical studies on angiostrongyliasis cantonensis among children in Taiwan.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 22(1): 194-199.

INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W.; SAWANYAWISUTH, K.; CHOTMONGKOL, V. (2003). **Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis.** *Parasitology Research*, 89 (6): 425-429.

JAROONVESAMA, N. (1988). **Differential diagnosis of eosinophilic meningitis.** *Parasitol Today*, 4: 262-6.

JIN, E.; MA, D.; LIANG, Y.; JI, A.; GAN, S. (2005). **MRI findings of eosinophilic myelomeningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis*.** *Clin Radiol*, 60: 242-50.

KANPITTAYA, J.; JITPIMOLMARD, S.; TIAMKAO, S.; MAIRIANG, E. (2000) **MR findings of eosinophilic meningo-encephalitis attributed to *Angiostrongylus cantonensis***. *Am J Neuroradiol*, 21: 1090-4.

KLOSE, J. (1975). **Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals**. *Humangenetics*, 26 (3): 231–243.

KOO, J.; PIEN, F.; KLIKS, M. M. (1988). **Angiostrongylus (Parastrongylus) eosinophilic meningitis**. *Rev Infect Dis*, 10: 1155-1162.

KUBERSKI, T.; WALLACE, G. D. (1979). **Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis***. *Neurology*, 29: 1566-1570.

KUBERSKI, T.; BART, R. D.; BRILEY, J. M.; ROSEN, L. (1979). **Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of a child with eosinophilic meningitis**. *J Clin Microbiol*, 9: 629–631.

LEONE, S.; de MARCO, M.; GHIRGA, P.; NICASTRI, E.; ESPOSITO, M.; NARCISO, P. (2007). **Eosinophilic meningitis in a returned traveler from Santo Domingo: case report and review**. *J Travel Med* 14: 407–410.

LIMA, A. R. M. C.; MESQUITA, S. D.; SANTOS, S. S.; AQUINO, E. R. P.; ROSA L. R. S.; DUARTE, F. S.; TEIXEIRA, A. O.; COSTA, Z. R. S.; FERREIRA, M. L. B. (2009). **Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil**. *Arq Neuropsiquiatr* 64 (4): 1093-1096.

LIMA, L. K.; MASSARA, C. L.; SOUZA, D. E. C. P.; VIDIGAL, T. D.; LENZI, H.; CARVALHO, O. S. (1992). **Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE)**. *Rev Inst Med Trop*, 34 (5): 399-402.

LORIA-CORTES, R.; LOBO-SANAHUJA, J. F. (1980). **Clinical abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis***. *Am J Trop Med Hyg*, 29: 538-544.

MENDONÇA, C. L. G. F.; CARVALHO, O. S.; MOTA, E. M.; PELAJO-MACHADO, M.; CAPUTO, L. F. G.; LENZI, H. L. (1999). **Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*)**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 549-556.

MESÉN-RAMÍREZ, P.; ABRAHAMS-SANDÍ, P. E.; FERNÁNDEZ-QUESADA, K.; MORERA, P. (2008). **Angiostrongylus costaricensis egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis.** *Journal of Helminthology*, 82: 251–254

MORERA, P. (1973). **Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971).** *Am J Trop Med Hyg*, 22 (5): 613-621.

MORERA, P. (1985). **Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health.** *Parasitology Today*, 1: 173–175.

MORERA, P.; CESPEDES, R. (1971). **Angiostrongilosis Abdominal – una nueva parasitosis humana.** *Acta Med Cost*, 14(3): 159- 173.

MORERA, P.; BONTEMPO, I. (1985). **Accion de algunos antihelminticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*.** *Rev Med Hosp Nac Niños Costa Rica*, 20 (2): 165-174.

MORERA, P.; PEREZ, F.; MORA, F.; CASTRO, L. (1982). **Visceral larva migrans-like syndrome caused by *Angiostrongylus costaricensis*.** *Am J Trop Med Hyg*, 31: 67-70.

MORERA, P.; ANDREWS, K. L.; RUEDA, D. (1988). **The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras.** *Rev. Biol. Trop.*, 36: 575-576.

MOTA, E. M.; LENZI, H. L. (1995). **Life cycle: *Angiostrongylus costaricensis* a new proposal.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 707-709.

MOTA, E. M.; LENZI, H. L. (2005). ***Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 (4): 407-420.

MULLIGAN, M. J. ; VASU, R. ; GROSSI, C. E. ; PRASTHOFER, E. F; GRIFFIN, F. M. Jr.; KAPILA, A.; TRUPP, J. M.; BARTON, J. C. (1988). **Case report: neoplastic meningitis with eosinophilic pleocytosis in Hodgkin's disease: a case with cerebellar dysfunction and a review of the literature.** *Am J Med Sci*, 296: 322-326.

NOMURA, S.; LIN, H. (1945). **First clinical case of *Hemostrongylus ratti*.** *J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 589-590.

NUAMTANONG, S. (1996). **The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 27 (2): 291-296.

O'FARRELL, P. H. (1975). **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J. Biol. Chem.*, 250: 4007–4021.

OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. (2010). **Taenia saginata metacestode antigenic fractions without affinity to concanavalin A are na important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis.** *Clin Vaccine Immunol*, 17: 638-644.

PARKHOUSE, R. M. E.; HARRISON, L. J. (1987). **Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of Taenia sp. Metacestodes.** *Parasite Immunology*, 9: 263-8.

PARKHOUSE, R. M. E.; HARRISON L. J. S. (1989). **Antigens of parasitic helminth in diagnosis, protection and pathology.** *Parasitology*, 99: S5-S19.

PENA, J. P. M.; ANDRADE-FILHO, J. S.; ASSIS, S. C. (1995). **Angiostrongylus costaricensis: First record of its occurrence in the state of Espirito Santo, Brazil and a review of its geographic distribution.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, 37: 369-374.

PENNINGTON, S. R.; WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F.; DUNN, M. J. (1997). **Proteome analysis: From protein characterization to biological function.** *Trends in Cell Biology*, 7: 168–173.

PIEN, F. D.; PIEN, B. C. (1999). **Angiostrongylus cantonensis Eosinophilic Meningitis.** *International Journal of Infectious Diseases*, 3(3): 61-163.

PROMMINDAROJ, K.; LEELAWONGS, N.; PRADATSUNDARASAR, A. (1962). **Human angiostrongyliasis of the eye in Bangkok.** *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 11:759–761.

QUINN, J. P.; WEINSTEIN, R. A.; CAPLAN, L. R. (1984). **Eosinophilic meningitis and ibuprofen therapy.** *Neurology*, 34:108-109.

RAMBO, R. P.; AGOSTINI, A. A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (1997). **Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate host from eighteen endemic foci.** *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* 92: 9-14.

REY, L. (2001). **Parasitologia.** Editora Guanabara Koogan S.A., 3º edição: 621-623.

ROCHA, A.; MOSCARDINI-SOBRINHO, J.; SALOMÃO, E. C. (1991). **Angiostrongilíase Abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24: 265-268.

RODRIGUES, R. M.; de OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. (2007). **IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen.** *Parasitol Res* 101: 1209-1214.

RODRIGUEZ, R.; DEQUI, R. M.; PERUZZO, L.; MESQUITA, P. M.; GARCIA, E.; FORNARI, F. (2008). **Abdominal Angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 50 (6):339-341

SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. (2006). **Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and echinococcosis.** *Parasitol Int*, 55: 69-73.

SHIH, S. L.; HSU, C. H.; HUANG, F. Y.; SHEN, E. Y.; LIN, J. C. (1992). **Angiostrongylus cantonensis infection in infants and young children.** *Pediatr Infect Dis J* 11: 1064-1066.

SILBERRING, J.; CIBOROWSKI, P. (2010). **Biomarker discovery and clinical proteomics.** *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2).

SILVA, A. C. A. da; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ZAHA, A. A. (2003). **Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients.** *Rev. Inst Med Trop.*, 45 (5): 295-297.

SLOM, T. J.; CORTESE, M. M.; GERBER, S. I. (2002). **An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean.** *N. Engl. J. Med.* 346: 668–675.

THIENGO, S. C. (1996). **Mode of infection *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda).** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 277-278.

TSAI, H. C.; LIU, Y. C.; KUNIN, C. M.; LEE, S. S.; CHEN, Y. S.; LIN, H. H.; TSAI, T. H.; LIN, W. R.; HUANG, C. K.; YEN, M. Y.; YEN, C. M. (2001). **Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases.** *Am. J. Med.* 111: 109–114.

TSAI, H. C.; LIU, Y. C.; KUNIN, C. M.; LAI, P. H. ; LEE, S. S. ; CHEN, Y. S. (2003). **Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* associated with eating raw snails: correlation of brain magnetic resonance imaging scans with clinical findings.** *Am J Trop Med Hyg*, 68: 281-5.

TSAI, H. C.; LEE, S. S.; HUANG, C. K.; YEN, C. M. ; CHEN, E. R. ; LIU, Y. C. (2004). **Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71: 222–226.

TUNG, H.; RAFFEL, C.; MCCOMB, J. G. (1991). **Ventricular cerebrospinal fluid eosinophilia in children with ventriculoperitoneal shunts.** *J Neurosurg*, 75:541-544.

UBELAKER, J. E.; BULLICK, G. R.; CARUSO, J. (1980). **Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*.** *J. Parasit.*, 66 (5): 856-857.

UBELAKER, J. E., CARUSO, J.; PEÑA, A. (1981). **Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis*.** *J. Parasitol.* 67 (2): 219-221.

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M.; LIVRAMENTO, J. A.; da SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, A. W. (1997). **Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*.** *Am J Trop Med Hyg*, 57 (3): 354-357.

WANG, Q. P.; LAI, D. H.; ZHU, X. Q.; CHEN, X. G.; LUN, Z. R. (2008) **Human angiostrongyliasis.** *Lancet Infect Dis*, 8: 621-30

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.-C.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, G.; HUMPHREY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. (1996). **From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.** *BioTechnology* 14, 61-65.

ZANINI, M. G.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (1995). **Angiostrongilose abdominal: profilaxia pela destruição das larvas infectantes em alimentos tratados com sal, vinagre e hipoclorito de sódio.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28: 389-392.

ZILIOOTTO, J. A.; KUNZLE, J. E.; FERNANDES, L. A. R.; PRATES-CAMPOS, J. C.; BRITO-COSTA, R. (1975). **Angiostrongilíase: apresentação de provável caso.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, 17:312-318.

ZUO X.; KIBEOM L.; DAVID S. (2004) **Electrophoretic prefractionation for comprehensive analysis of proteomes.** *Proteome Analysis. Interpreting the Genome*, Capítulo 4: 93-118.