

# PUCRS

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Estudo do compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus*  
spp. e outros helmintos.**

**Bianca Barbieri Cognato**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429**

**Fone: (051) 320-3500 - Fax: (051) 339-1564**

**CEP 90619-900 Porto Alegre - RS**

**Brasil**

**2013**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

Estudo do compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp. e outros  
helminthos.

**Bianca Barbieri Cognato**

**Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira**

**Co-Orientadora: Dra. Alessandra L. Morassutti**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PORTO ALEGRE- RS- BRASIL**

**2013**

## SUMÁRIO

<b>Relação de figuras</b> .....	<b>III</b>
<b>Relação de tabelas</b> .....	<b>VI</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>VII</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 Parasitos .....	10
1.2 <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	10
1.2.1 Ciclo de vida.....	12
1.2.2 Distribuição .....	13
1.2.3 Diagnóstico .....	15
1.3 <i>Angiostrongylus costaricensis</i> .....	16
1.3.1 Ciclo de vida.....	17
1.3.2 Distribuição .....	18
1.3.3 Diagnóstico .....	19
1.4 Reatividade Cruzada.....	20
1.5 Reatividade cruzada e helmintos.....	21
1.6 Reatividade cruzada e alergenos .....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral .....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Locais de execução.....	28
4.2 Obtenção dos ovos de <i>Strongyloides</i> spp.....	28
4.3 Manutenção in vitro para obtenção de L3 (larvas de terceiro estágio) de <i>Strongyloides</i> spp.....	28
4.4 Obtenção de vermes adultos de <i>Strongyloides</i> spp.....	28
4.5 Amostras de soro de pacientes com Angiostrongilíase.....	29
4.6 Obtenção de antígenos de <i>Strongyloides</i> spp., <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Toxocara canis</i> e <i>Hymenolepis nana</i> .....	29
4.7 Obtenção de antígenos dos possíveis alergenos .....	29
4.8 Eletroforese Unidimensional e Bidimensional.....	30

4.9 Western Blot.....	30
4.10 Medição das bandas .....	31
4.11 Espectrometria de massas e identificação de proteínas .....	31
4.12 Questões Éticas .....	33
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 Obtenção dos ovos de <i>Strongyloides</i> spp.....	34
5.2 Manutenção <i>in vitro</i> para obtenção de L3 (larvas de terceiro estágio) de <i>Strongyloides</i> spp.....	36
5.3 Obtenção de vermes adultos de <i>Strongyloides</i> spp.....	36
5.4 Obtenção de antígenos .....	37
5.5 Eletroforese Bidimensional .....	38
5.6 Eletroforese Unidimensional.....	39
5.7 Western Blot.....	39
5.8 Espectrometria de massas e identificação de proteínas .....	48
5.9 Reconhecimento de HSPs .....	52
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>69</b>

## Relação de figuras

Figura 1 – Verme de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . Em “A” verme fêmea mostrando o intestino e tubo reprodutor espiralado. Em “B” verme macho, mostrando em detalhe o espículo.....	11
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . .....	13
Figura 3 – Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . .....	14
Figura 4 – Distribuição de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> no Brasil. Pontos verdes destacando casos de doença humana. Pontos rosa destacando hospedeiros intermediários ou roedores contendo o parasito. ....	14
Figura 5 – Vermes de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> visualizados nas artérias mesentéricas de roedor infectado experimentalmente com o nematódeo. ....	16
Figura 6 – Ciclo de vida de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> . .....	18
Figura 7 – Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> . .....	19
Figura 8 – Esquema de reatividade cruzada, quando um determinado antígeno não específico se liga a um anticorpo. ....	20
Figura 9 – Ovo de <i>Hymenolepis diminuta</i> encontrado nas fezes de ratazana naturalmente infectada. ....	34
Figura 10 – Ovo de <i>Strongyloides</i> spp. encontrado nas fezes de ratazana naturalmente infectada. ....	35
Figura 11 – Verme de <i>Hymenolepis diminuta</i> encontrado no intestino delgado de ratazana naturalmente infectada. ....	35
Figura 12 – Ovos de <i>Syphacia</i> spp. encontrados nas fezes de ratazana naturalmente infectada. ....	35
Figura 13 – Verme de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> encontrado no intestino de ratazana naturalmente infectada. ....	36
Figura 14 – Diferentes larvas obtidas através do processo de Sedimentação espontânea. Em detalhe, no centro da foto A, uma larva de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . ....	37
Figura 15 – Gel Bidimensional de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> utilizando 90µg de proteínas. ....	38
Figura 16 – Gel Bidimensional de <i>Fasciola hepatica</i> utilizando 90µg de proteínas. ....	38
Figura 17 – Gel unidimensional, utilizando 5µg de antígeno de cada parasito. 1 – <i>Fasciola hepatica</i> ; 2 – <i>Ascaris lumbricoides</i> ; 3 – <i>Hymenolepis diminuta</i> ; 4 – <i>Toxocara canis</i> . ....	39
Figura 18 – Western Blot mostrando a reatividade cruzada entre todos os grupos de parasitos reagindo contra soro positivo para angiostrongilíase, com as respectivas	

concentrações 0,5µg e 1µg. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.  
.....40

Figura 19 – Gel unidimensional de poliacrilamida mostrando as bandas compartilhadas com o soro positivo para Angiostrongilíases, que foram recortadas e submetidas a espectrometria de massas. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.  
.....40

Figura 20 – Western Blot mostrando a reatividade cruzada utilizando antígenos dos possíveis alérgenos contra soro positivo para Angiostrongilíases. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.  
.....41

Figura 21 - Gel unidimensional mostrando as bandas compartilhadas pelo soro de Angiostrongilíases que foram recortadas e submetidas a espectrometria de massas. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.....41

Figura 22 – Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Toxocara canis* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase. ....42

Figura 23 – Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Angiostrongylus cantonensis* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase. ....43

Figura 24 – Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Ascaris lumbricoides* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase.....43

Figura 25 – Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Fasciola hepatica* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíases. ....44

Figura 26 – Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Hymenolepis diminuta* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíases. ....44

Figura 27 – Western Blot utilizando 5µg antígeno dos diferentes alérgenos contra soro negativo para Angiostrongilíases. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.  
.....45

Figura 28 – Western Blot utilizando 5µg antígeno dos diferentes alérgenos contra soro positivo para Angiostrongilíases. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.  
.....45

Figura 29 – Western Blot utilizando 5µg de antígeno de todos parasitos contra soro positivo para Angiostrongilíases. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.  
.....46

Figura 30 – Western Blot utilizando 5µg de antígeno de todos parasitos contra soro positivo para Angiostrongilíases. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.  
.....46

Figura 31 – Western Blot utilizando 5µg de antígeno de todos parasitos contra soro negativo para Angiostrongilíases. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*. .....47

Figura 32 – Western Blot utilizando 50µg de antígeno de amendoim contra 15 diferentes soros positivos para Angiostrongilíases.....47

Figura 33 – Western Blot utilizando 5µg de antígeno de todos os parasitos contra anti-HSP70. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.....52

Figura 34 – Western Blot utilizando 10µg de antígeno de todos parasitos contra anti - HSP70. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*. .....53

## Relação de tabelas

Tabela 1 - Quantidade de proteína encontrada em cada extrato bruto dos parasitos. .....	37
Tabela 2 - Resumo das bandas reconhecidas pelos parasitos e alérgeno amendoim quando em contato com soro positivo para Angiostrongilíases.....	42
Tabela 3 - Identificação de proteínas que foram recortadas dos géis de eletroforese unidimensional, submetidas à digestão por tripsina e analisadas por espectrometria de massas. ....	49
Tabela 4 - Distância percorrida pela banda no gel de poliacrilamida a partir do ponto de partida de migração do gel, correspondente ao reconhecimento destas bandas no Western Blot pelo soro positivo para Angiostrongilíases. ....	51



## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência, e por demonstrar tanto amor ao que faz.

Meu muito obrigado a todo o grupo de Parasitologia, pelos ensinamentos, pelas discussões, mas principalmente pelas amizades que conquistei nesses anos. Com certeza, mais do que colegas de trabalho, tenho grandes amigos.

Agradeço a Alessandra L. Morassutti, que sentou comigo e com tanto carinho explicou praticamente tudo que aprendi ao longo dos dois anos de mestrado. Muito, muito obrigada!

Minha linda e muito especial família, agradeço por terem sempre acreditado em mim. Amo muito todos vocês!

A todos meus queridos amigos da Biologia e da vida. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas, pela cumplicidade! Vocês são demais!

Agradeço meu namorado, Bruno meu lindo, principalmente pela paciência e por me mostrar que as coisas não são tão complicadas quanto parecem, e que a força que temos é sempre maior do que pensamos ter!

Muito obrigada a todos que fizeram parte dessa conquista!

## Resumo

Duas espécies de parasitos nematódeos da família *Angiostrongylidae*, do gênero *Angiostrongylus* de localização intra-arterial são capazes de produzir doença em humanos: *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus cantonensis*. Ambas as espécies são parasitos próprios de roedores e a infecção humana é considerada acidental. No homem, *A. cantonensis* é o causador da meningite eosinofílica e *A. costaricensis* causador da angiostrongilíase abdominal. Como não há eliminação de formas parasitárias na infecção humana, o diagnóstico se torna difícil e métodos moleculares se tornam necessários. Depois de anos da descoberta das angiostrongilíases, ainda há muitos esforços no estudo e desenvolvimento de um teste de diagnóstico específico e sensível capaz de discriminar as Angiostrongilíases de outras parasitoses. Neste contexto, a reatividade cruzada se torna um problema na especificidade de testes sorológicos. O objetivo principal deste trabalho foi analisar o compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp. e os parasitos *Strongyloides* spp., *Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis diminuta* e *Toxocara canis*, assim como identificar essas moléculas compartilhadas. Para obtenção de antígenos, algumas ratazanas foram capturadas e suas fezes analisadas através do método de Baerman além de terem sido semeadas em Placas de Ágar. Foram obtidas larvas de *Strongyloides* spp. e *Angiostrongylus* spp. Nas artérias pulmonares de uma ratazana foram encontrados 11 vermes fêmeas e 2 vermes machos de *A. cantonensis*, que deu origem ao primeiro relato da ocorrência deste parasito no Rio Grande do Sul. No intestino delgado foi obtido um verme de *Strongyloides* spp e da análise do intestino delgado foram obtidos vermes de *Hymenolepis diminuta*. A partir dos vermes adultos dos parasitos, foram obtidos os antígenos utilizados neste trabalho. Além disso, foram utilizados antígenos de alérgenos como o amendoim, tomate, pólen e morango. Para identificação dos antígenos compartilhados, as proteínas foram separadas por eletroforese uni e bidimensional ensaiadas pela técnica de Western-Blot utilizando-se soro de pacientes com angiostrongilíases. Todos os antígenos foram reconhecidos pelo soro de pacientes infectados com angiostrongilíases, sendo um total de quatorze bandas identificadas como imunogênicas. As quatorze bandas foram recortadas dos géis de poliacrilamida e analisadas por espectrometria de massas. As proteínas identificadas foram: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase, Proteína de choque térmico 70 (HSP70), Proteína hipotética DAPPUDRAFT, 60 kDa Chaperonina 5, Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, Cadeia A sigma classe GST, Glucose-6-fosfato isomerase, Piruvato desidrogenase subunidade E1, Glutamato desidrogenase 2, arachin Ahy-1, Full=Allergen Ara h 1, clone P41B, Gly1. Os dados gerados no presente trabalho demonstram que há compartilhamento de antígenos entre organismos de diferentes grupos taxonômicos, como também com os alérgenos testados. Além disso, a descrição e a análise de componentes moleculares compartilhados podem ajudar na compreensão da história evolutiva e da filogenia destes organismos.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*; *Angiostrongylus costaricensis*; reatividade cruzada;

## Abstract

Two species of parasites nematode of *Angiostrongylidae* family, genus *Angiostrongylus* intra-arterial localization are capable of human disease production: *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus cantonensis*. Both species are rodent's parasites and the human infection is considered incidental. On humans, *A. cantonensis* cause eosinophilic meningitis and *A. costaricensis* cause abdominal angiostrongyliase. Since there is no elimination of parasitic forms in human infection, diagnosis becomes difficult and molecular methods are necessary. After years of discovery of angiostrongyliases, there are still many efforts in the study and development of a specific and sensitive diagnostic test capable of discriminating Angiostrongyliases of the other parasites. In this context, cross-reactivity becomes a problem in specificity of serologic tests. The main objective of this study was to analyze the sharing of antigens between *Angiostrongylus* spp. and parasites *Strongyloides* spp., *Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis diminuta* and *Toxocara canis*, and identify these molecules shared. To obtain antigens, some rats were captures and their feces analyzed by the method of Baerman addition to being seeded Agar Plates. Were obtained larvae of *Strongyloides* spp. and *Angiostrongylus* spp. In pulmonary arteries were found 11 female worms and 2 male worms of *A. cantonensis*, which led to the first report of the occurrence of this parasite in Rio Grande do Sul. In the small intestine was obtained a *Strongyloides* spp worm and analysis of small intestine were obtained *Hymenolepis diminuta* worms. From the adult worms of parasites were obtained antigens used in this study. Furthermore, we used antigens of allergens such as peanut, tomato, strawberry and pollen. To identify shared antigens, proteins were separated by one and two dimensional electrophoresis technique assayed by Western blot using sera of patients with angiostrongyliases. All antigens were recognized by sera from patients infected with angiostrongyliases, being a total of fourteen bands identified as being immunogenic. The fourteen bands were cut out of polyacrylamide gels and analyzed by mass spectrometry. The proteins identified were: Phosphoenolpyruvate carboxykinase, heat shock protein 70 (HSP70), DAPPUDRAFT hypothetical protein, 60 kDa Chaperonin 5, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, sigma class GST Chain A, Glucose-6-phosphate isomerase, pyruvate dehydrogenase subunit E1, Glutamate dehydrogenase 2, arachin Ahy-1, Full = Allergen Ara h 1, clone P41B, Gly1. The data generated in this study show that there is sharing of antigens between organisms of different taxonomic groups, but also with allergens tested. Moreover, the description and analysis of shared molecular components can help in understanding the evolutionary history and phylogeny of these organisms.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; *Angiostrongylus costaricensis*; cross-reactivity

## 1. INTRODUÇÃO

Os organismos ao longo da evolução se diferenciam, e através de estudos filogenéticos é possível compreender a relação evolutiva entre os diferentes grupos. A taxonomia, classificação, identificação e designação dos organismos, são baseadas em informações da filogenia. Através destes estudos é possível compreender melhor as similaridades e diferenças entre organismos do mesmo ou de diferentes grupos.

As espécies *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, são helmintos nematódeos estudados no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS e são o elemento central de projetos e estudos, no desenvolvimento de testes de diagnóstico. Para o estudo de reatividade cruzada feito neste trabalho, foi feita a análise de extratos protéicos de outros helmintos (buscando similaridades e diferenças) e outras substâncias alergênicas comparando com soros de pacientes positivos para angiostrongilíases, disponíveis na soroteca do Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

### 1.1 Parasitos

Na superfamília Metastrongyloidea, o gênero *Angiostrongylus* possui pelo menos 20 espécies de parasitos infectantes para as espécies de mamíferos (Bhaibulaya, 1991). Duas espécies de localização intra-arterial, pertencentes a esta superfamília, são capazes de produzir doença em humanos: *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus cantonensis* (Rey, 1991). Ambos são parasitas próprios de roedores e a infecção humana é considerada acidental. Uberlaker, 1986 sugeriu que estas duas espécies fossem reorganizadas para um novo gênero: *Parastrongylus*. Contudo, até hoje essa nova organização não tem sido utilizada.

### 1.2 *Angiostrongylus cantonensis*

O verme *Angiostrongylus cantonensis* (Fig. 1) foi descoberto nas artérias pulmonares e coração de ratos domésticos em Guangzhou, China, por Chen em 1935. Este parasito está associado à meningite eosinofílica no homem, e foi recuperado (larvas L5) pela primeira vez em Taiwan no ano de 1944, no líquido de um homem jovem com sintomas de meningite (Nomura & Lin, 1945).

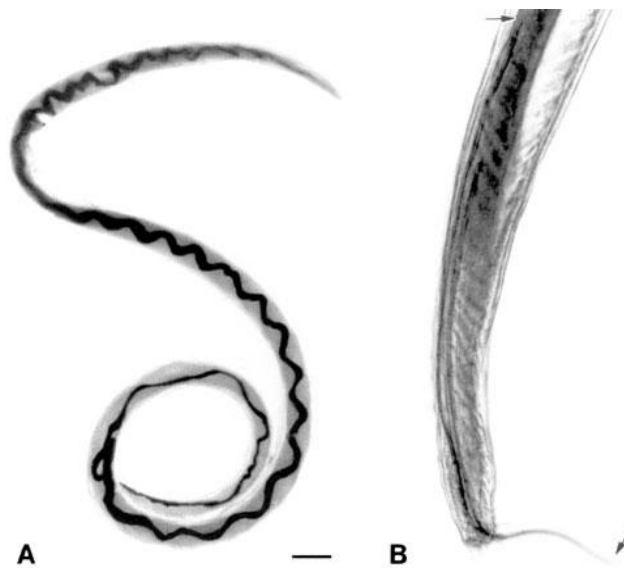


Figura 1 – Verme de *Angiostrongylus cantonensis*. Em “A” verme fêmea mostrando o intestino e tubo reprodutor espiralado. Em “B” verme macho, mostrando em detalhe o espículo. (Fonte: Lindo, et al 2002).

Vermes adultos machos medem em torno de 20-25 mm de comprimento e 0,32mm a 0,42mm de largura. Na cavidade bucal possuem dois dentes laterais, sem lábios. Possuem um esôfago claviforme e um poro excretor logo após o esôfago. As espículas são ligeiramente iguais em comprimento. Possuem bursa copulatória de aproximadamente 50 $\mu$ m de tamanho e possuindo pares de raios ventrais, laterais, mediolaterais, externolaterais, dorsais e espículas bem desenvolvidas que determinam a espécie. Vermes adultos de fêmeas medem em torno de 22-34 mm de comprimento e 0,34 a 0,56 de largura. A cutícula é fina e transparente, podendo-se perceber o disposição helicoidal dos órgãos genitais em torno do tubo digestivo, contrastando sua coloração esbranquiçada com a tonalidade avermelhada do intestino. Apresenta uma ligeira dilatação na cutícula da extremidade cefálica, abertura bucal pequena e ovalada e apresentando seis papilas peribucais. (Topley & Wilson's, 1998).

### 1.2.1 Ciclo de vida

No ciclo evolutivo (Fig. 2) as larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas nas fezes dos roedores e no hospedeiro intermediário evoluem para L3 (larvas de terceiro estágio). *A. cantonensis* possui ciclo vital heteroxênico, utiliza uma variedade de moluscos como hospedeiro intermediário, entre eles caramujos como *Bradybaena similaris*, lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras*. Como hospedeiros definitivos destacam-se *Rattus rattus* e *R. norvegicus*. A presença do parasito também foi relatada em porcos e cabras (Alicata 1963, 1964b). As L3, são infectantes para os vertebrados, são neurotrópicas e, no hospedeiro natural, migram para o cérebro onde crescem e amadurecem para adultos. Os vermes adultos migram para a artéria pulmonar onde se reproduzem e os ovos são liberados. Os ovos se desenvolvem em larvas de primeiro estágio, estas, penetram na cavidade aérea do pulmão, migram para o trato respiratório e são eliminadas nas fezes do hospedeiro.

O homem pode adquirir a infecção através da ingestão de alimentos crus contendo as larvas infectantes ou por ingestão dos hospedeiros intermediários. Uma vez engolidas, as larvas invadem o tecido intestinal, antes de chegar ao fígado. No homem, após duas semanas, as larvas chegam ao sistema nervoso central, causando uma intensa reação inflamatória retendo as larvas que acabam morrendo nas meninges que, por sua vez, causam forte reação inflamatória que desenvolve a meningite eosinofílica seguida de encefalite. Assim como parasitos do gênero *Gnathostoma* e a cisticercose, a angiostrongilíase pode se localizar no globo ocular, uma localização não muito frequente, mas aparentemente relacionada a características de neotropismo, causando assim a Angiostrongilíase Ocular (Sinawat et al, 2008; Wang et al, 2008). A meningite eosinofílica ocorre, pois o parasito aloja-se no sistema nervoso central. A patogenia depende diretamente dos danos causados pela movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa. Os sintomas em pacientes adultos são principalmente dores de cabeça (95%), rigidez do pescoço (46%), vômito (38%) e náuseas (28%) (Wang et al., 2008). Esta infecção não possui tratamento anti-helmíntico específico, e a eficácia deste tratamento em eliminar o verme ainda não foi comprovada.

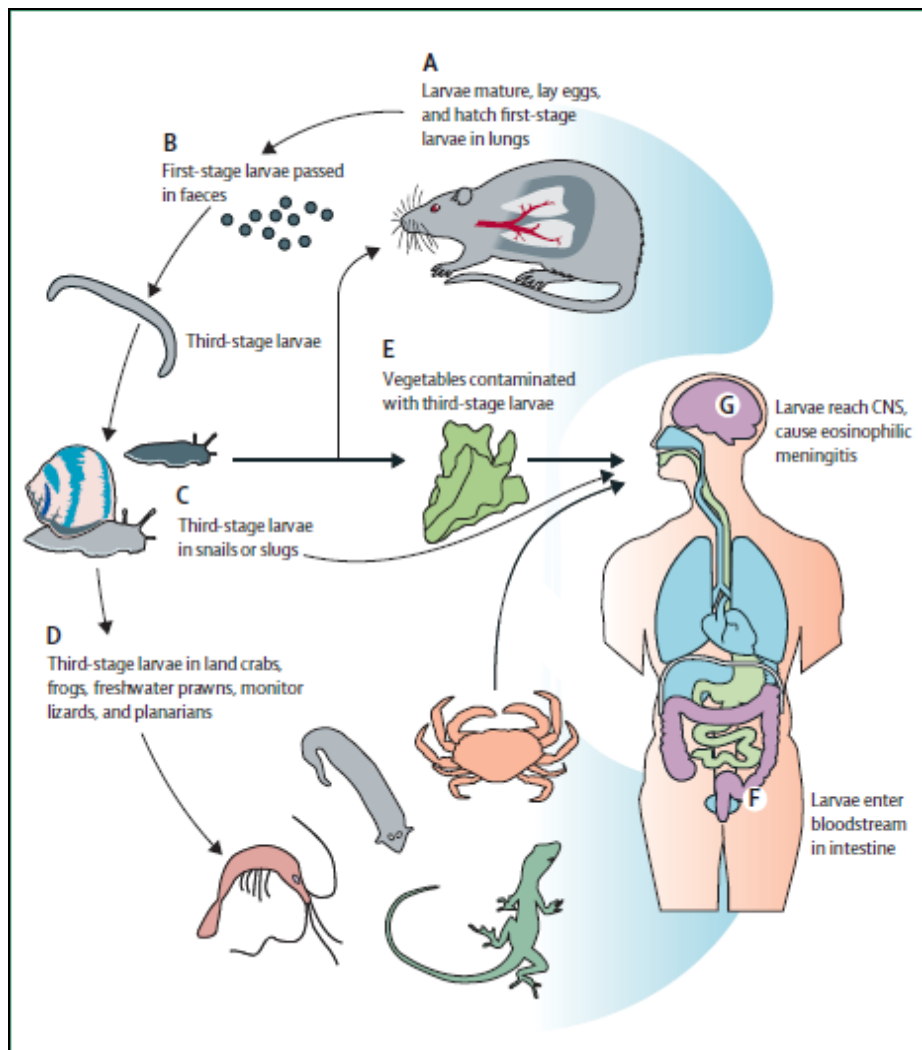


Figura 2 – Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang et al., 2008)

### 1.2.2 Distribuição

Segundo Wang et al (2008) mais de 2820 casos já foram relatados em mais de 30 países (Figura 3), e infecções humanas já foram descritas na Ásia (Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Hong Kong e Japão), Taiti, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné, Austrália e desde 2007 no Brasil.

A identificação do parasito e o isolado em laboratório foi reportado pela primeira vez no Brasil no estado do Espírito Santo após o diagnóstico de meningite eosinofílica em dois pacientes (Caldeira et al, 2007), seguido de dois casos em Pernambuco (Lima et al, 2009). Larvas, vermes e DNA de *A. cantonensis* já foram detectados em hospedeiros em várias regiões da costa brasileira (Carvalho et al, 2012), assim como nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Pará e

Rio Grande do Sul. (Vide apêndice, Cognato et al, 2012). (Teles et al, 1997; Neuhaus et al, 2007; Simões et al, 2011; Maldonado et al, 2010; Moreira et al, 2012;) (Fig. 4).

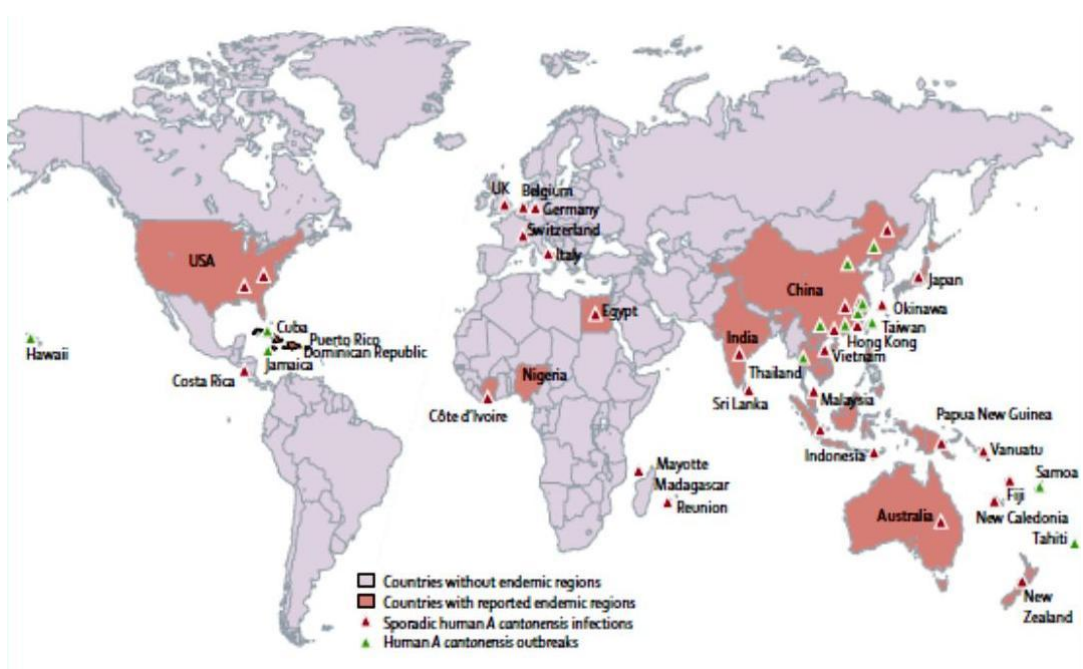


Figura 3 – Distribuição mundial de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang et al, 2008)



Figura 4 – Distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. Pontos verde destacando casos de doença humana. Pontos rosa destacando hospedeiros intermediários ou roedores naturalmente infectados. (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, 2012).



As regiões brasileiras onde já foi reportada a presença de *A. cantonensis* são regiões portuárias ou próximas de portos. O parasito dissemina-se pela introdução de hospedeiros infectados trazidos por navios cargueiros vindos de regiões endêmicas, trazendo ratazanas ou hospedeiros intermediários infectados (Graeff-Teixeira, 2007). Aguiar et al 1981, relataram casos de meningite eosinofílica em regiões de Havana, Cuba, onde ratazanas e moluscos foram encontrados naturalmente infectados.

### 1.2.3 Diagnóstico

A recuperação de larvas de *A. cantonensis* no líquido e na câmara do olho confirmam a angiostrongilíase humana. Contudo, a frequência de detecção é muito baixa. Larvas foram recuperadas em apenas 28 (11%) de 259 casos humanos em Taiwan, e apenas 10 (2%) de 484 casos humanos na Tailândia (Wang et al, 2008). O histórico de ingestão do hospedeiro intermediário é de grande importância para o diagnóstico da infecção (Wang et al, 2008). Na maior parte dos casos de angiostrongilíases, só se tem o diagnóstico quando se isola o parasito, ou através de sorologia, portanto o diagnóstico diferencial da meningite eosinofílica é importante visando à exclusão de casos de outras parasitoses cujas manifestações clínicas são semelhantes. A eosinofilia acima de 10% no líquido é indicativa da infecção por *A. cantonensis*, porém também poderá ocorrer em infecções com helmintos dos gêneros *Gnathostoma*, *Paragonimus*, *Toxocara*, *Trichinella* e *Taenia* entre outros. (Graeff-Teixeira et al, 2007; Cross, 1987; Jaroonvesama, 1988). Raramente a confirmação do diagnóstico se dá pelo encontro de larvas no líquido cefalorraquidiano (LCR) ou na cavidade orbitária do indivíduo infectado (Eamsobhana, 2006), portanto testes sorológicos são alternativas importantes para o diagnóstico, sendo o método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) o mais empregado (Eamsobhana et al., 2009).

Diversas proteínas já foram descritas para utilização no diagnóstico da angiostrongilíase. Dentre estas, um componente de 31 kDa tem demonstrado resultados promissores no diagnóstico da angiostrongilíase cerebral. Após etapas de purificação, este antígeno apresentou sensibilidade e especificidade de 100% pelo teste de ELISA (Eamsobhana et al, 1997; Eamsobhana et al, 2009, Kirsch et al, 2008).

### 1.3 *Angiostrongylus costaricensis*

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo *Angiostrongylus costaricensis* (Fig. 5), um nematódeo próprio de roedores silvestres. A espécie foi descrita na Costa Rica, por Pedro Morera e Rodolfo Céspedes em 1971 após o registro e estudo de várias lesões intestinais caracterizadas por processo inflamatório intestinal granulomatoso com intensa eosinofilia. (Céspedes et al, 1967)

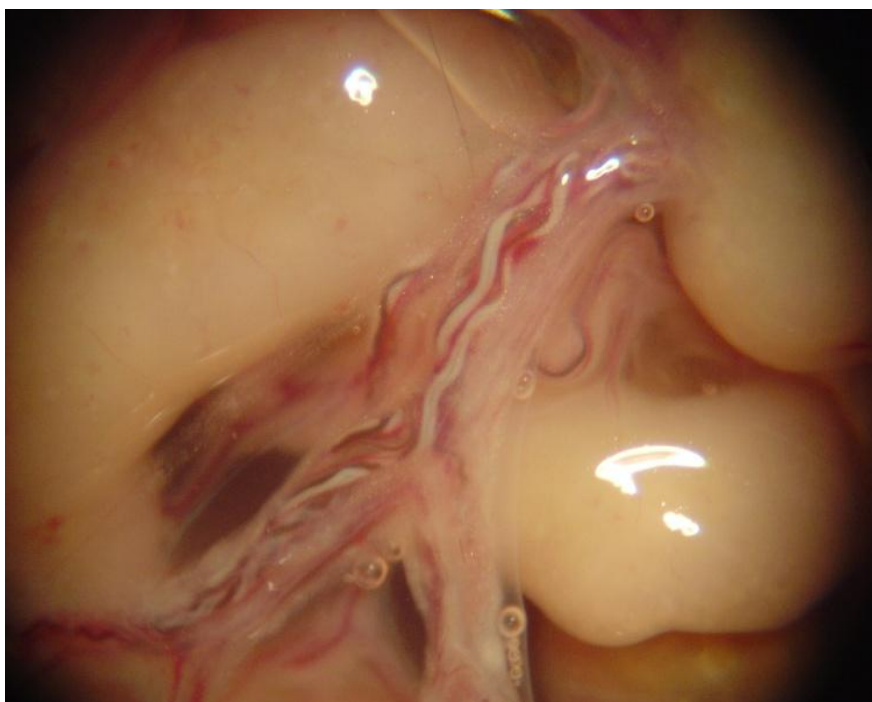


Figura 5 – Vermes de *Angiostrongylus costaricensis* visualizados nas artérias mesentéricas de roedor silvestre (*Oligoryzomys nigripes*) infectado experimentalmente com o nematódeo. (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS)

A morfologia do verme adulto foi descrita pela primeira vez por Morera & Céspedes, 1971. O *Angiostrongylus costaricensis* é um verme filiforme, apresentando a extremidade anterior arredondada e provida de três pequenos lábios. Encontram-se aí seis papilas sensoriais dispostas em dois círculos. A cutícula é transparente e lisa, exceto nas extremidades, quando é mais espessa e ligeiramente estriada. A fêmea mede em torno de 24 a 27 mm de comprimento e 0,30 mm de largura (Morera & Céspedes, 1971), possui esôfago claviforme e intestino simples. O macho mede cerca de 15 a 18 mm de comprimento por 0,28 mm de largura (Santos, 1985), com tubo digestivo do mesmo tipo e testículo longo, cujo canal se abre em uma bolsa copuladora, de tamanho médio provida de dois espículos delgados (Morera, 1973; Rey, 1991)

### 1.3.1 Ciclo de vida

As larvas de primeiro estágio são liberadas juntamente com as fezes de roedores infectados. Moluscos ingerem as larvas que chegam ao tecido fibromuscular, local onde sofrem a primeira muda durante o quarto dia de infecção, se transformando em larvas de segundo estágio. Entre o 11º e 12º dia pós-infecção sofrem mais uma muda, tornando-se L3, infectivas para os vertebrados, podendo ser eliminadas juntamente com o muco liberado pelos moluscos. Após a ingestão das L3, através da alimentação por frutas, verduras ou o próprio molusco, larvas penetram à parede do íleo-terminal, onde migram pelos vasos linfáticos mesentéricos, diferenciando-se em larvas de quinto estágio. Após cerca de uma semana, essas retornam ao intestino onde vão atingir a maturidade sexual, tornando-se vermes adultos. (Mota & Lenzi, 1995)

O homem, ingerindo as larvas de terceiro estágio, pode desenvolver a infecção e apresentar doença, a qual pode ser reconhecida a partir de quadros clínicos de abdômen agudo. Os vermes podem desenvolver lesões sobre o endotélio das artérias mesentéricas, além do desenvolvimento de reações inflamatórias associados aos ovos, larvas e produtos excretados por estes parasitos (Morera & Céspedes, 1971; Morera, 1985). Mota e Lenzi (1995) propuseram um ciclo que difere do anteriormente descrito, pela existência de uma via pulmonar para a passagem da circulação linfática venosa para o sistema arterial e de uma via venosa portal. Angiostrongilíase abdominal tem variada gravidade podendo comprometer a região da válvula íleo-cecal, apêndice (Céspedes et al, 1967, Loria-Cortes & Lobo-Sanahuja, 1980) e intestino delgado (Graeff-Teixeira, 1986). A doença pode evoluir para a oclusão intestinal com agravamento da dor, distensão abdominal, ruídos hipercinéticos e parada na eliminação de fezes.

Como sintomas, os pacientes podem apresentar dores abdominais, febre, anorexia, mal-estar, náusea, vômitos, constipação ou diarreia (Graeff-Teixeira, 1987). Essa infecção também não possui tratamento efetivo (Mentz et al, 2004) e, a sua rápida evolução leva, muitas vezes, a exigir intervenção cirúrgica (Graeff-Teixeira et al, 1991).(Fig. 6).

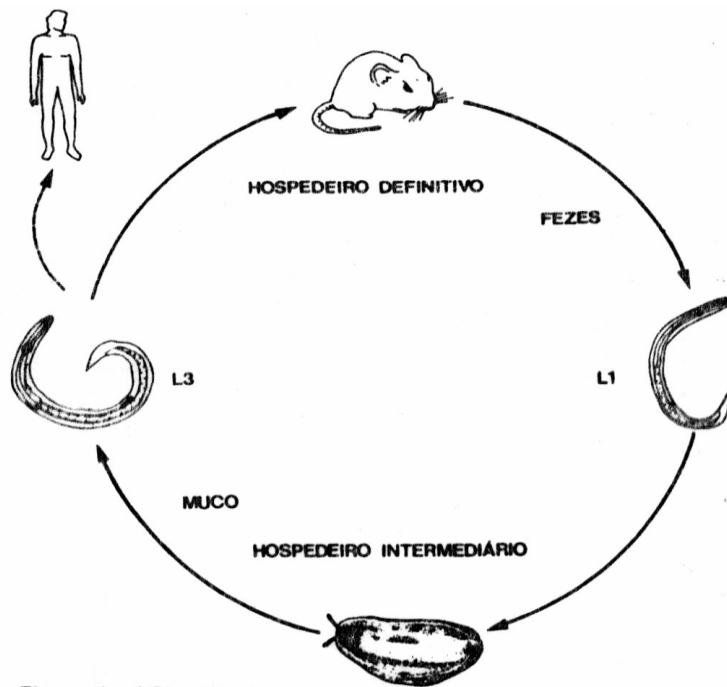


Figura 6 – Ciclo de vida de *Angiostrongylus costaricensis* (Fonte: Rey, 1991)

### 1.3.2 Distribuição

Esta parasitose tem sido registrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, descreveram-se casos no Distrito Federal (Barbosa et al, 1980), no Espírito Santo (Pena, Andrade-Filho & Assis, 1995), em Minas Gerais (Rocha, Moscardini-Sobrinho & Salomão, 1991), no sul do estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ziliotto et al, 1975; Ayala, 1982; Agostini et al, 1984) (Fig. 7).

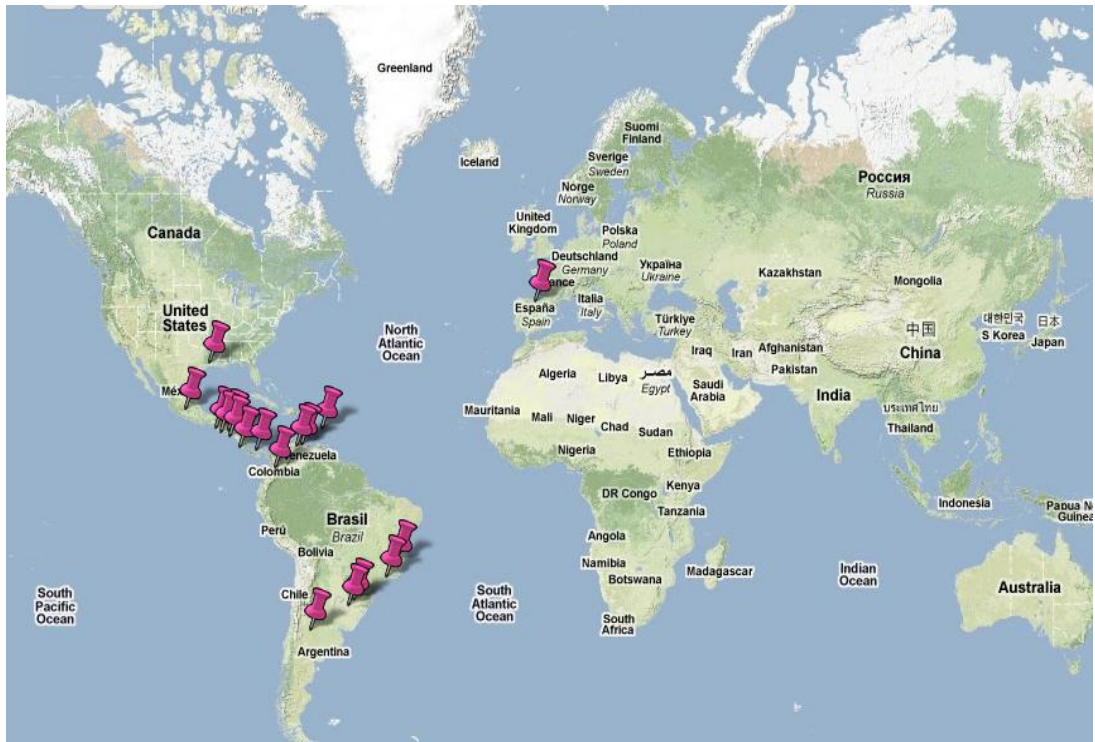


Figura 7 – Distribuição mundial de *Angiostrongylus costaricensis* (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, 2010).

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 (Graeff-Teixeira, et al 1991). Estes costumam ocorrer no final da primavera, verão e início do inverno, mostrando sazonalidade. As baixas temperaturas provavelmente inibem a evolução das larvas nos moluscos (Ishii, 1984) e, além disso, o calor e a umidade da primavera e verão coincidem com a reprodução e maior atividade das lesmas.

### 1.3.3 Diagnóstico

Já que não há relato da presença de ovos ou larvas desse nematódeo ao exame parasitológico de fezes (Mojon 1994; Pena, et al 1995), o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal deve ser feito por métodos imunológicos. Na Costa Rica é empregado um teste de aglutinação em látex (Lobo-Sanahuja, et al 1987) e no Brasil está disponível um teste de ELISA, com sensibilidade de 76% e especificidade de 98%, para detecção da fase aguda da infecção (Graeff-Teixeira et al, 1997). Silva, et al 2003 propuseram uma PCR para detecção de ácidos nucleicos do parasito presentes no soro de pacientes.

No entanto, o diagnóstico definitivo é feito nos cortes histológicos de biópsia ou peças cirúrgicas (Graeff-Teixeira, et al 1991) evidenciando a presença de nematódeos ou ovos intra-arteriais.

#### 1.4 Reatividade Cruzada

Embora as reações antígeno-anticorpo sejam altamente específicas, em alguns casos o anticorpo induzido por um antígeno pode reagir de maneira cruzada com um antígeno não relacionado. Esta reatividade cruzada ocorre quando dois antígenos diferentes compartilham um epitopo idêntico não relacionado que possui propriedades químicas similares. (Kuby, 2008)

Reações cruzadas aparecem porque o antígeno envolvido na reação cruzada compartilha um mesmo epitopo com o antígeno imunizador ou porque ele tem um epitopo que é estruturalmente semelhante ao epitopo do antígeno imunizante (multi-especificidade). (Fig.8)

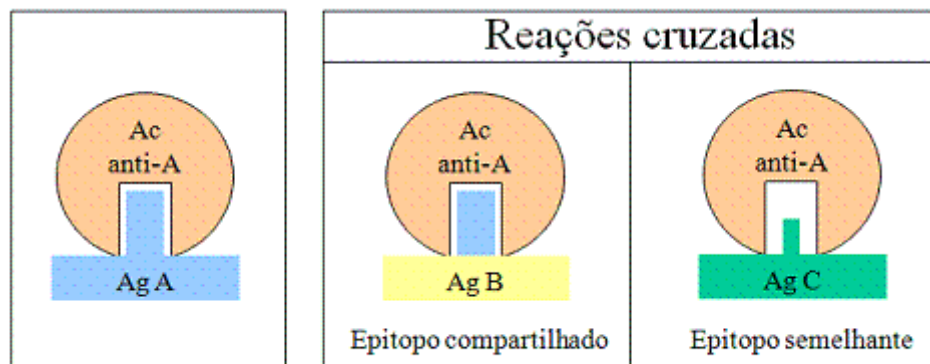


Figura 8 – Esquema de reatividade cruzada, quando um determinado antígeno não específico se liga a um anticorpo. Fonte: Microbiologia e Imunologia online <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter7.htm>

Os testes imunológicos utilizados no diagnóstico de diversas parasitoses apresentam muitas vezes a limitação quanto a obtenção de antígenos específicos, ou seja, antígenos exclusivos de um determinado organismo cuja infecção queremos diagnosticar pela detecção dos anticorpos produzidos. Isso se deve ao fato do compartilhamento de moléculas homólogas entre grupos taxonômicos próximos. A reatividade cruzada entre *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis* com outros helmintos já foi relatada em ensaios de detecção de anticorpos em indivíduos infectados com *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*,

*Schistosoma japonicum*, *Paragonimus westermani*, *Clonorchis sinensis*, *Echinococcus granulosus*, *Spirometra erinacei*, *Taenia solium*. (Chen et al, 2011). Vitta et al, 2010 demonstraram reatividade cruzada com *Gnathostoma sp*, *Wuchereria bancrofti*, *Paragonimus westermani* e *Opisthorchis viverrini*. Dekumyoy et al, 2000 obtiveram em seus experimentos casos de reatividade cruzada com *Strongyloides spp.*, *Toxocara spp.*, além de outros já citados. Nuamtanong, 1996 demonstraram reatividade cruzada com *Trichinella spiralis*, *Trichuris spp.* e *Opisthorchis spp.* Eamsobhana et al, 1998 mostraram reatividade cruzada entre o extrato bruto de *A. cantonensis* com *Gnathostoma spinigerum*, um parasito clinicamente relacionado com *A. cantonensis*.

*A. cantonensis* e *A. costaricensis* são organismos congenéricos, e, portanto compartilham vários determinantes antigênicos (Dekumyoy et al, 2000). A utilização de antígenos para o imunodiagnóstico da angiostrongilíase é dificultado pela obtenção de material biológico. *A. cantonensis* pode ser mantido em laboratório com mais eficácia e prover grandes quantidades de antígenos heterólogos. Estes antígenos podem ser usados no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico que detectam reatividade cruzada com anticorpos de *A. costaricensis*. (Ben et al, 2010). *A. cantonensis* e *A. costaricensis* compartilham epitopos antigênicos comuns, onde há anticorpos que reconhecem proteínas de ambas as espécies. Morassutti et al, 2012, isolaram e caracterizaram o componente de 31 kDa presente no extrato bruto de vermes de *A. cantonensis*. A análise por eletroforese bidimensional revelou a presença de quatro spots, onde pelo menos três diferentes proteínas em cada um dos spots foram identificadas: subunidade épsilon do coatomero, proteína 14-3-3 e proteína contendo domínio NAC. Este componente apresentou reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *Strongyloides spp.*, *Trichinella spp.*, *Echinococcus spp.*, e *Toxocara spp.*, sugerindo compartilhamento antigênico de algumas proteínas entre parasitos nesta mesma região o que torna o estudo do compartilhamento indispensável para futuros testes de diagnóstico.

### **1.5 Reatividade cruzada e helmintos**

Estrongiloidíase, causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*, é uma das mais importantes infecções intestinais em humanos e está distribuído por todo mundo em países tropicais e países de clima temperado (Grove, 1996). No Brasil, as infecções variam muito com a região, sendo que Uberlândia, cidade localizada na região sudeste, no estado de Minas Gerais, é considerado uma região hiperendêmica

para *S. stercoralis* (Machado & Costa-Cruz, 1998). No Brasil, a prevalência da doença fica em torno de 3 a 13%, ocorrendo de forma assintomática na maior parte dos indivíduos infectados. Contudo, é considerado de grande importância por causar hiperinfecção e disseminação em pacientes imunodeprimidos, principalmente sob o uso de corticóides. O diagnóstico definitivo geralmente é feito mediante a detecção de larvas nas fezes; mas como a quantidade de parasitos é baixa na maioria dos casos e a eliminação de larvas é reduzida e irregular, esta se torna extremamente difícil. (Silva, et al 2003). Sendo assim, o desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase torna-se uma alternativa necessária. (Liu &Weller, 1993). Um dos grandes problemas envolvendo a estrogiloidíase é em relação à dificuldade de se detectar larvas em fezes humanas, em função da maioria dos casos envolverem doença crônica, baixos níveis de infecção e eliminação larval mínima e de forma irregular. Apesar do método da placa de Ágar para cultura de fezes parecer mais eficaz do que métodos parasitológicos mais comumente utilizados, ainda assim é uma técnica custosa e pouco sensível em alguns casos de pouca ou irregular eliminação de larvas. (Arakaki et al, 1990; Sato et al, 1995; Dreyer et al, 1996; Uparanukraw et al, 1999). Detecção de anticorpos pelo teste IFAT (*Indirect fluorescent antibody test*) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) podem servir como complemento ao diagnóstico parasitológico das estrogiloidíases (Conway et al, 1993a, Costa-Cruz et al 1997, De Paula et al 2000), porém estes testes já demonstraram reatividade cruzada com filária, esquistossomos, ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria* e *Echinococcus*. (Gam et al, 1987, Conway et al, 1993a,b, Lindo et al, 1994). Yoshiya et al, 1985 demonstraram que a reatividade cruzada de soros humanos com outros helmintos é significativamente mais fraca se comparada com *Strongyloides* spp.

*Toxocara canis* é o principal causador da toxocaríase humana, sendo considerado um grave problema epidemiológico em vários países. O homem é considerado um hospedeiro acidental, e pode vir a se infectar ingerindo os ovos dos parasitos ou então ingerindo fígado de aves ou bovinos infectados. (Despommier, 2003; Morimatsu et al, 2006; Yoshikawa et al, 2008; Choi et al, 2012). Apesar da maioria das infecções causadas por *Toxocara* spp. serem assintomáticas, a migração das larvas em órgãos internos através do sangue pode causar uma variedade de manifestações clínicas, como larva migrans visceral, larva migrans ocular, meningoencefalite eosinofílica, toxocaríase oculta e neurotoxocaríase (Glickman, 1993; Fan et al, 2003). O exame de biópsia do tecido afetado pode indicar um diagnóstico definitivo, porém tais biópsias raramente estão disponíveis. Portanto, o diagnóstico confirmatório da toxocaríase humana tem sido feito em larga escala



através do imunodiagnóstico e/ou técnicas moleculares. O teste de ELISA baseado em antígenos de excreção-secreção de larvas de *T. canis*, é um método sensível e específico para detecção de *T. canis* em infecções humanas, porém a eficácia destes ensaios é reduzida pelo problema da reatividade cruzada de moléculas, especialmente em países subdesenvolvidos, onde é mais comum o poliparasitismo. (Smith et al, 2009).

Ascariase é o parasitismo desenvolvido no homem pelo nematódeo denominado *Ascaris lumbricoides*. Esta é a mais cosmopolita e a mais freqüente das helmintíases humanas, principalmente em países subdesenvolvidos onde as condições de saneamento básico são precárias ou inexistentes. A OMS (2000) estimou em um bilhão e meio o número de pessoas infectadas, das quais 400 milhões apresentavam sintomatologia, havendo cerca de 100 mil mortes concentradas nos países subdesenvolvidos da África, Ásia, Oceania e Américas. Em 1974, Stoll calculou que 30% da população mundial estariam infectadas com o parasito. Na maioria dos casos a infecção é leve e clinicamente benigna, se bem que um único verme possa responder por acidentes graves, de natureza obstrutiva, exigindo tratamento cirúrgico de urgência. O diagnóstico dessa parasitose é feito através de exame direto de fezes (sedimentação espontânea). A ascariase é uma infecção parasitária de fácil contaminação, ocorrendo pela ingestão dos ovos embrionados, ou pela ingestão de alimentos mal lavados. O número de ovos diários depositados pela fêmea é de aproximadamente 200.000 por dia, e a viabilidade dos ovos pode durar meses em condições favoráveis de temperatura e umidade. Todos esses fatores ajudam na disseminação do parasito e da infecção, tornando a co-infecção de *Ascaris lumbricoides* com outros parasitos muito comum. Yang & Kennedy (1979) observaram reação cruzada no teste de ELISA entre soros de pacientes com infecções causadas com *Toxocara canis* e *Ascaris lumbricoides*. Além da diversidade de estudos relacionando a Ascariase com doenças alérgicas. (Gardette et al, 2012).

Fasciolose é uma das principais doenças parasitárias em animais, podendo infectar o homem através do parasito *Fasciola hepatica*. Este trematódeo está distribuído mundialmente, sendo mais encontrado em regiões temperadas. (Mas-Coma S, 2005). A fasciolose tem grande impacto econômico sobre a indústria de criação de animais em todo mundo, devido as grandes perdas que pode causar. A Organização Mundial da Saúde reconheceu a fasciolose humana como um grave problema de saúde pública, com uma estimativa de 17 milhões de pessoas infectadas no mundo todo. O número de casos humanos ainda não é estimado corretamente em muitos países, isto porque o diagnóstico parasitológico é dificultado, pois nas primeiras semanas de infecção não é possível a visualização de ovos nas fezes. (Tantrawatpan,

C et al, 2003). Em função disso, diagnóstico sorológico se torna importante, já que anticorpos podem ser detectados antes mesmo das duas primeiras semanas, o que facilita um tratamento precoce e previne danos irreversíveis ao fígado.

*Hymenolepis diminuta*, também conhecida como a tênia do rato, é raramente encontrado em seres humanos, e é adquirida pela ingestão acidental do hospedeiro intermediário, artrópodes contendo a larva cisticercóide. A infecção por *H. diminuta* em humanos é rara, tipicamente ocorre em casos isolados, tais como os relatos de casos que descrevem um único indivíduo infectado (Levi et al, 1987; Varghese et al, 1998). Poucos casos foram relatados especialmente em crianças com taxa de prevalência que variam entre 0,001% e 5,5% (McMillan et al, 1971; Naqira et al, 1973; Panpiglione et al, 1987; Lo et al, 1989; Mercado & Arias, 1995; Tena et al, 1998). Apenas na Guatemala constatou-se incidência de 1% em um inquérito coprológico. Em condições favoráveis para a transmissão, com grande densidade de ratos, como se observou em determinadas regiões da Índia, a prevalência pode chegar a 6% na população humana. A maioria das infecções geralmente é assintomática, mas ocasionalmente, os pacientes podem apresentar coceira e leves desconfortos gastrointestinais tais como dor abdominal, irritabilidade e diarreia. Sua importância médica é quase nula, porém a literatura científica sobre a biologia e imunologia é vastíssima, por constituir excelente modelo laboratorial para estudo de cestóides e da relação parasito-hospedeiro. (McKay, 2010).

O fato de uma grande quantidade de pessoas estarem infectadas em regiões de alta endemicidade para parasitoses poderia afetar a especificidade dos testes para o diagnóstico das angiostrongilíases, já que foi demonstrada a reatividade cruzada com vários grupos. Com o objetivo de se estudar o compartilhamento de antígenos utilizando diferentes grupos taxonômicos, foi utilizado os parasitos citados acima.

## **1.6 Reatividade cruzada e alergen**

Doenças alérgicas e infecções por helmintos são consideradas condições médicas distintas, porém, nas últimas décadas, recentes descobertas indicam uma associação entre elas. A natureza desta relação e os mecanismos envolvidos ainda não estão claros e geram controvérsia. Em ambas reações, a resposta imune tem papel central para restaurar o equilíbrio e são caracterizadas por altos níveis de IgE, eosinofilia, aumento de mastócitos e células T que secretam preferencialmente citocinas próprias da resposta regulada por células Th2. Estudos epidemiológicos mostram que doenças alérgicas e helmintíases são inversamente associadas. Um

exemplo recente entre essas relações está o trabalho de (Pinto et al, 2004), onde testaram a hipótese e confirmaram de que a infecção por *Angiostrongylus costaricensis* diminuiu a resposta inflamatória no pulmão de camundongos infectados. Tudo isso pode ser explicado também pela teoria da higiene, onde relata que a redução a exposição a micróbios, e uma subsequente ausência de resposta imunológica a estes organismos, são responsáveis pelo aumento da prevalência de doenças alérgicas. (Strachan, 1989)

A característica mais intrigante da imunidade tipo 2 (relacionada a alergias e doenças parasitárias) é a sua propensão de ser ativada em resposta a uma grande variedade de substâncias ambientais, como os alérgenos. Não há uma classificação específica para estas substâncias, pois não compartilham qualquer propriedade que poderia defini-los como tal. (Aalberse, 2000). Portanto, alérgenos são aquelas substâncias que desencadeiam qualquer resposta alérgica.

Além das proteínas, que são amplamente estudadas em relação a sua composição, identificação e interação nos organismos, assim como na reatividade cruzada, estão também uma classe de compostos que há pouco tempo não era considerada imunogênico, os açúcares. Helminhos em geral, possuem em sua superfície grandes quantidades de glicanos, ou seja, açúcares. Assim como outros animais, possuem a capacidade de sintetizar glicolipídios, polissacarídeos e glicosaminoglicanos (Cummings & Nyame 1996; Khoo & Dell 2001). Os parasitos utilizam esse mecanismo de síntese de açúcares como uma forma de sobrevivência e defesa, regulando e suprimindo a resposta imune do hospedeiro. Em alguns casos, os glicanos imunogênicos parecem estar restritos a um ou algumas espécies, tais como tyvelose contendo glicano encontrados no parasito *Trichinella spiralis*, zoonose causadora da triquinelose em humanos (Reason et al, 1994).

Com o intuito de verificar a reação cruzada entre a resposta imunológica das infecções com os parasitos já citados anteriormente, foram testados os seguintes alérgenos: amendoim, morango, pólen, tomate, que em algum nível possuem açúcares em sua composição.

## 2. JUSTIFICATIVA

Principalmente pela expansão do número de casos e aumento da área geográfica de ocorrência, especialmente a angiostrongilíase cerebral tem causado preocupação nos últimos anos (Wang et al, 2008). Como visto anteriormente, nessas parasitoses não há eliminação de formas parasitárias na infecção humana, exigindo assim métodos moleculares para o diagnóstico. Porém, até hoje, quase 80 anos após o descobrimento do parasito e da doença não foi desenvolvido um teste de diagnóstico específico e sensível capaz de discriminar as Angiostrongilíases de outras parasitoses e com reagentes amplamente disponíveis e produzidos de forma reprodutível. A reatividade cruzada tem sido um problema para o desempenho satisfatório de especificidade de testes sorológicos (Graeff-Teixeira et al, 1997; Mesén-Ramirez et al, 2008). Durante o estabelecimento do parasitismo muitas moléculas provenientes do parasito e do hospedeiro interagem entre si, sendo principalmente produtos da degradação celular gerada no momento da infecção, desprendimento cuticular, ou pela excreção de metabólitos do parasito (Morassutti et al, 2012). Estas moléculas, também são capazes de gerar ou induzir uma resposta imune humoral, o que propicia os estudos imunológicos para o diagnóstico. No caso das angiostrongilíases, já foi demonstrado que pacientes infectado com outros helmintos são capazes de reagir com antígenos brutos de *Angiostrongylus* spp. o que torna o estudo compartilhamento destas moléculas dos diferentes grupos de parasitos citados nesse trabalho fundamental para o melhoramento dos métodos de diagnóstico desta parasitose.

Portanto, a compreensão das moléculas compartilhadas entre os diferentes grupos taxonômicos capazes de gerar resposta imunológica inespecífica podem auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos subtraindo antígenos compartilhados e/ou selecionando compostos específicos de cada espécie. Além disso, este trabalho poderá aprimorar a compreensão dos mecanismos de reconhecimento e dos processos de evolução molecular de diferentes grupos de helmintos. É relevante ressaltar também a importância do conhecimento destes antígenos como marcadores de relações filogenéticas para serem usados como uma ferramenta de proximidade filogenética entre espécies. O objetivo principal deste trabalho foi identificar quais moléculas são compartilhadas por *A. cantonensis* e parasitos de diferentes grupos taxonômicos, eventualmente parasitando humanos, como os nematódeos *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides* spp; o cestódeo *Hymenolepis diminuta*, e o trematódeo *Fasciola hepatica*, como também os possíveis alérgenos amendoim, morango, pólen e tomate.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar a reatividade cruzada entre *A. cantonensis*, outros helmintos e alergenicos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Verificar se há compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp e os seguintes helmintos *Strongyloides* spp *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Hymenolepis diminuta* e *Fasciola hepatica*.

Verificar se há compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp e alergenicos.

Identificar componentes compartilhados pelos diferentes parasitos e alergenicos.

Identificar componentes do extrato bruto de L3 de *Strongyloides* spp. reconhecidos por soros de pacientes infectados por *Angiostrongylus* spp.

Investigar a utilidade de extratos protéicos de *Strongyloides* spp. para remoção de antígenos de reatividade cruzada com *Angiostrongylus* spp.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Locais de execução**

O projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas PUCRS, Laboratório de Proteômica da UNIPAMPA e Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Departamento de Biotecnologia da UFRGS.

### **4.2 Obtenção dos ovos de *Strongyloides* spp.**

Para a obtenção dos ovos de *Strongyloides* spp. foram coletadas fezes de ratazanas naturalmente infectadas. Para tanto, foram espalhadas pelo Campus central da PUCRS, com a devida autorização da Prefeitura Universitária, armadilhas para a coleta das ratazanas, que foram atraídas por iscas (chocolate, presunto, pasta de amendoim). O animal foi mantido em cativeiro, dentro das armadilhas, apenas pelo tempo necessário para coleta de suas fezes. Após a coleta, as mesmas foram abertas e os animais foram devolvidos ao seu habitat natural. As fezes recolhidas foram submetidas ao método de sedimentação espontânea, para a obtenção dos ovos.

### **4.3 Manutenção *in vitro* para obtenção de L3 (larvas de terceiro estágio) de *Strongyloides* spp.**

Os ovos foram mantidos em placas de ágar como descrito por (Arakaki, 1990), à temperatura de 27°C em câmara climática com umidade controlada, para o desenvolvimento das larvas de primeiro e posteriormente terceiro estágio.

### **4.4 Obtenção de vermes adultos de *Strongyloides* spp.**

Cinco ratos (*Rattus norvegicus*) adultos foram infectados através de inoculação subcutânea com aproximadamente 1.500 L3 provenientes da cultura *in vitro*. Os animais foram anestesiados previamente com Isoflurano por inalação, e eutanasiados com CO<sub>2</sub> após quatro dias de infecção. Vermes adultos foram retirados da mucosa do intestino delgado através de raspagem da mucosa do intestino com o auxílio de espátula estéril.

#### **4.5 Amostras de soro de pacientes com Angiostrongilíase**

Foram utilizadas amostras de soro humano de pacientes com Angiostrongilíase abdominal e Angiostrongilíase cerebral. Ambas as amostras foram provenientes da soroteca mantida no Laboratório Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

#### **4.6 Obtenção de antígenos de *Strongyloides* spp., *Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis* e *Hymenolepis diminuta***

Antígenos dos diferentes parasitos foram obtidos através da maceração dos seus vermes adultos. *Strongyloides* spp. e *Hymenolepis diminuta* foram recuperados da mucosa do intestino delgado de ratos naturalmente infectados. Vermes de *Toxocara canis* foram coletados a partir de fezes de cachorros naturalmente infectados pelo parasito. Os vermes de *Fasciola hepatica* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Cancela, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, obtidos a partir de fígados de bovinos infectados. Para a extração de antígenos de *A.lumbricoides*, recuperado de amostra de fezes humanas cedida pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, *T.canis* e *H. diminuta* foi utilizado 0,330g de vermes de cada parasito. Aproximadamente 40 vermes fêmeas de *A. cantonensis* foram usados para a extração. Os vermes foram macerados em um microtubo com a ajuda de um pistilo e nitrogênio líquido, e adicionado tampão de extração contendo 10µl de detergente triton X 14, 10ml de PBS e 20µl de inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 40 minutos em uma centrífuga a 4°C, e após a retirada de todo sobrenadante, foi feito a quantificação das proteínas através do Kit Qubit da Invitrogen.

#### **4.7 Obtenção de antígenos dos possíveis alérgenos**

A obtenção das moléculas antigênicas dos possíveis alérgenos amendoim, morango, pólen e tomate foram feitos seguindo o mesmo protocolo de extração descrito no item 4.6.

#### 4.8 Eletroforese Unidimensional e Bidimensional

As moléculas obtidas da extração de antígenos citados nos itens anteriores (4.6 e 4.7) foram separadas pelo método de eletroforeses uni e bidimensional. Na eletroforese bidimensional, durante a primeira dimensão denominada focalização isoeétrica (IEF), as proteínas são separadas em um gradiente de pH imobilizado. Quando estas proteínas são submetidas a uma corrente elétrica, elas migram até atingirem uma posição estacionária onde possuam carga líquida zero (ponto isoeétrico). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, que separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares. Como os parâmetros usados na primeira dimensão (ponto isoeétrico) e na segunda dimensão (massa molecular) são independentes, uma grande resolução é atingida.

Para a primeira dimensão, as moléculas obtidas foram precipitadas com 1,5ml de TCA (ácido tricloroacético) em acetona 20%, deixadas *overnight* e após submetidas a passos de lavagem com acetona. Após, o material foi ressuscitado em tampão de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 % (w/v), DTT 66 mM e anfólitos 0,5 % (v/v) (Amersham Bioscience/GE Healthcare). As amostras foram aplicadas às tiras de 7 cm de pH imobilizado (IPG, GE Healthcare, Piscataway, NJ) com intervalo de pH 3-10. A focalização isoeétrica foi feita com a utilização do equipamento Multiphor II (GE, USA) de acordo com o protocolo já estabelecido anteriormente (Morassutti et al., 2012).

Para a segunda dimensão, as tiras foram equilibradas com tampão contendo glicerol 30 %, uréia 6 M, DTT 1 % e SDS 2 %, por 10 minutos e depois com o mesmo tampão com a adição de 4 % de iodacetamida por mais 10 minutos. Após o equilíbrio das tiras e para as separações por eletroforese unidimensional foi utilizado gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) para a separação das proteínas por massa molecular. A corrida foi realizada a 120 V por 1 hora.

#### 4.9 Western Blot

Após a separação das moléculas pela eletroforese uni e/ou bidimensional, a visualização das moléculas de possível reatividade cruzada foi analisada pelo método de Western Blot. Os extratos dos diferentes parasitos foram separados por



eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham), utilizando-se o sistema de transferência em banho (GE, USA) em tampão glicina contendo metanol (0,25M de TRIS, 1,91M de glicina e metanol 20%).

Após a transferência as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas *overnight* à 4° C, com solução bloqueadora (bloto), contendo PBS Tween-20 a 0,05 % (PBST) e leite desnatado 5 %. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBST à temperatura ambiente e depois incubada por 1 hora a 37° C com soro de pacientes, na proporção de 1/100 em bloto. Após, a membrana foi lavada novamente por 3 vezes durante 5 minutos com PBST à temperatura ambiente e então, incubada com anticorpo secundário acoplado com peroxidase (anti IgG humano), diluído em bloto (1/2000) por uma hora a 37° C. Após outras três lavagens, a revelação da reação foi feita através de incubação com DAB (diaminobenzidina) e adição do substrato da enzima, peróxido de hidrogênio 0,015% em PBS. A análise dos *spots* (pontos de reconhecimento) e das bandas imunogênicas foi feita através da visualização dos géis.

#### **4.10 Medição das bandas**

As bandas das proteínas contidas nos géis foram comparadas às bandas reconhecidas pelo soro positivo de angiostrongilíases nas membranas provenientes dos experimentos de Western Blot, através da medição das distâncias percorridas pelas proteínas com uma régua milimetrada. Como parâmetro de início da corrida foi desenhado uma linha cor de rosa na membrana, e a partir dessa marca foi determinada a distância percorrida pela banda. Após a identificação da banda correspondente no gel estas foram recortadas do gel SDS-PAGE com bisturi e analisadas pelo método de espectrometria de massas.

#### **4.11 Espectrometria de massas e identificação de proteínas**

A identificação das proteínas presentes nos *spots* ou bandas imunogênicas obtidas através da eletroforese unidimensional/bidimensional e revelação do Western blot foram feitas por espectrometria de massas, utilizando o equipamento Q-TOF MS/MS em colaboração com o Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Sendo que os arquivos gerados pelo espectrômetro foram analisados pelo programa de identificação de peptídeos MASCOT. ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html))

**Digestão em gel das amostras:** As amostras de proteínas foram digeridas com solução de tripsina (20ng/μL) como descrito por Shevchenko e colaboradores (1996), e os peptídeos obtidos foram dessalinizados usando OASIS HLB (Waters, Milford, USA). Para a digestão em gel das amostras, as bandas foram recortadas cuidadosamente do gel SDS-PAGE com o auxílio de bisturi. As bandas foram submetidas a uma solução contendo 50% de metanol e 5% de ácido acético em água *overnight* à temperatura ambiente. Após este período essa mesma solução foi substituída por mais 200μl por mais 3 horas. Após este período essa mesma solução foi descartada e aos géis foi adicionado 200μl de acetonitrila, que após 5 minutos foi descartada. As amostras foram submetidas a uma centrifuga a vácuo para a evaporação de qualquer resíduo de acetonitrila por mais 3 minutos. Após esta etapa foi adicionado 50μl de DTT 10mM por 30 minutos e após descartado para que fosse adicionado a mesma quantidade de iodacetamida 50mM pelo mesmo período de tempo a temperatura ambiente. As amostras então foram lavadas com 100 μl de bicarbonato de amônio 100mM e descartado após 10 minutos. As amostras foram desidratadas com 200μl de acetonitrila por mais 5 minutos, e descartada para a adição de 100μl de bicarbonato de amônio por mais 10 minutos. Após este período, foi removido e foram adicionadas mais duas etapas de acetonitrila com 200μl cada. Após as etapas de acetonitrila, as amostras foram submetidas novamente a centrifuga a vácuo por 3 minutos. 50μl de solução de tripsina foi adicionado às amostras por 10 minutos no gelo. O excesso de tripsina foi removido e adicionado 20μl de bicarbonato de amônio 50mM *overnight* a 37°C. Após este período, foi adicionado 30μl de bicarbonato de amônio 100mM, levados ao vortex e incubadas por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e colocado em um novo microtubo. Os peptídeos foram extraídos do gel adicionando 30μl de solução de extração (5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila), incubado por 10 minutos e então coletados e colocados no novo microtubo. O processo foi repetido e adicionado ao obtido anteriormente. As amostras foram centrifugadas e evaporadas até a formação de *pellets*. Os *pellets* foram ressuspensos em 10μl ácido fórmico 0,1%, e então levados a espectrômetro de massas.

**Análise por espectrometria de massas e identificação dos peptídeos:** Os peptídeos foram analisados pelo equipamento de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) Waters nanoACQUITY UPLC, Waters Micromass Q-ToF Micro or Q-ToF Premier (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Os peptídeos foram eluídos a partir da coluna de fase reversa para espectrômetro de massa a uma razão de fluxo de 200nl/min, em um gradiente linear de 10-50% água/acetonitrila, durante 30 minutos. As análises foram realizadas usando

dados dependentes do modo de aquisição (DDA). Comutação automática de MS para MS/MS foi realizada para a contagem de íons precursores que foram maiores a 8, e a energia de colisão MS/MS foi dependente de um íon precursor  $m/z$  e do estado de carga. Experimentos de espectrometria de massas foram realizados em duplicata.

Os dados obtidos por MS/MS foram processados usando o programa MASCOT software (Matrix Science, London, UK) utilizando DATABASE (NCBIInr). Para esse procedimento foram utilizados os seguintes parâmetros: máximo de um sítio de clivagem perdida, alquilação carbamidometilação fixa de cisteínas, oxidação variável de metioninas e uma tolerância de 0,1 unidades de massa e fragmentos de íons.

#### **4.12 Questões Éticas**

Os animais foram tratados de acordo com as regulamentações brasileiras, lei 11794-08/10/2008, decreto 6899-15/07/2009 e das recomendações seguidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONEA), e com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética, registro CEUA 11/00279.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtenção dos ovos de *Strongyloides* spp.

Com o objetivo de se obter ovos de *Strongyloides* spp. para o desenvolvimento de larvas e vermes adultos, foram feitas várias tentativas de captura de ratazanas naturalmente infectadas.

Duas ratazanas foram capturadas e mantidas em caixas de plástico, com recolhimento diário das fezes e limpeza. As fezes coletadas eram submetidas ao método de Baermann (Baermann, 1917). Após a análise do material fixado em lâminas e visualizado em microscópio óptico, foram observados ovos de vários parasitos, como de *Strongyloides* spp, (Fig.10) *Syphacia* spp (Fig.12 A e B) e *Hymenolepis diminuta*. (Fig. 9)

Durante o processo de captura, uma terceira ratazana foi coletada e após algumas horas veio ao óbito. O animal foi levado à necropsia, e foram encontrados vermes adultos de *Hymenolepis diminuta* no intestino delgado, (Fig. 11) e de *Nippostrongylus brasiliensis* no intestino delgado (Fig. 13 A e B). Nas artérias pulmonares do roedor foram encontrados vermes de *Angiostrongylus cantonensis*, achado que deu origem ao artigo apresentado no apêndice deste trabalho, e que será submetido à revista Emerging Infections Diseases (CDC). (apêndice 1)

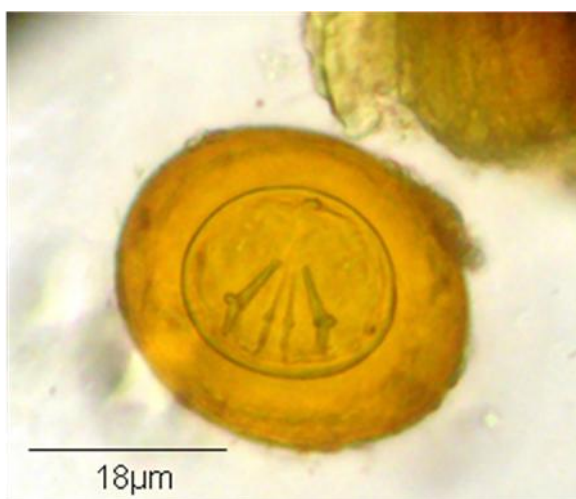


Figura 9: Ovo de *Hymenolepis diminuta* encontrado nas fezes de ratazana naturalmente infectada. (400x)



Figura 10: Ovo de *Strongyloides* spp. encontrado nas fezes de ratazana naturalmente infectada. (400x)



Figura 11: Verme adulto de *Hymenolepis diminuta* encontrado no intestino delgado de ratazana naturalmente infectada. (4x)

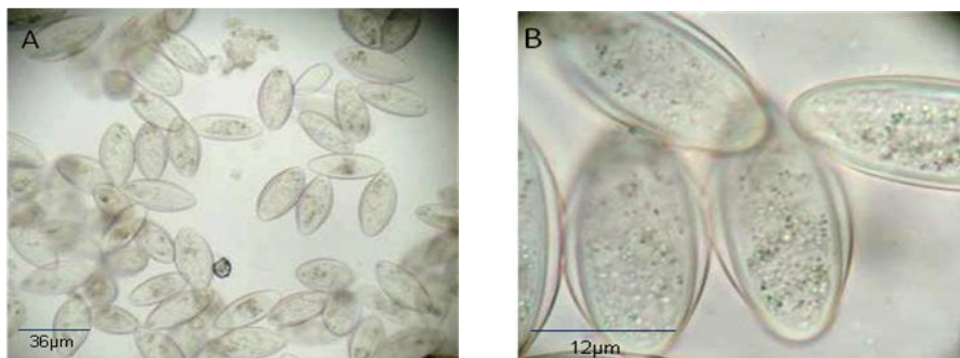


Figura 12 A e B: Ovos de *Syphacia* spp. encontrados nas fezes de ratazana naturalmente infectada. (100x e 400x respectivamente)

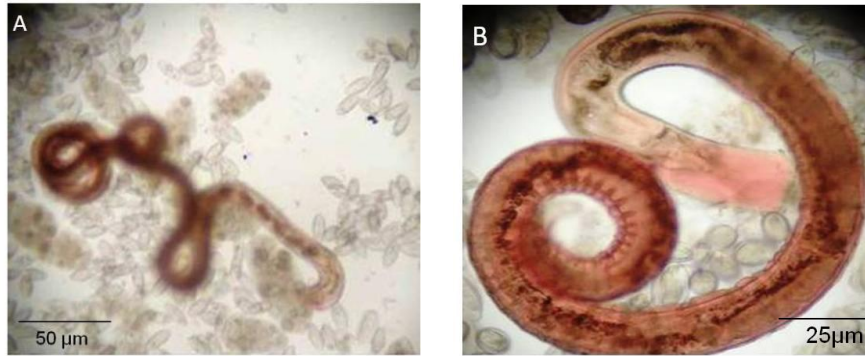


Figura 13 A e B: Verme de *Nippostrongylus brasiliensis* encontrado no intestino grosso de ratazana naturalmente infectada. (100x e 400x respectivamente)

### **5.2 Manutenção *in vitro* para obtenção de L3 (larvas de terceiro estágio) de *Strongyloides* spp.**

As fezes obtidas das ratazanas capturadas foram semeadas em placas de ágar (Arakaki, 1990) das seguintes maneiras: suspensão resultante do método de Baerman: **a)** isolada ou contendo fezes da ratazana; **b)** desmanchadas ou **c)** inteiras.

Nas duas primeiras tentativas nenhum verme adulto foi recuperado. Como já descrito na literatura, larvas de *Strongyloides* spp. cultivadas em placas de ágar são capazes de se desenvolver, podendo chegar a fase L3 ou até mesmo vermes adultos. Porém, nenhuma larva foi capaz de se desenvolver nesse meio e não tivemos êxito na tentativa de conseguir desenvolvimento de larvas através da manutenção das placas de ágar. Desta forma o material obtido de fezes de ratazanas não foi suficiente para obtenção de antígenos para os testes programados.

### **5.3 Obtenção de vermes adultos de *Strongyloides* spp.**

Algumas fezes coletadas foram processadas pelo método de sedimentação espontânea, e o sedimento analisado em microscópio óptico. Vários tipos de larvas foram encontradas, possuindo morfologia semelhante. Havia também larvas com movimentação e morfologia características da espécie *A. cantonensis*, bem como possíveis larvas de *Strongyloides* spp. (Fig. 14). Porém, nenhum verme adulto foi obtido.

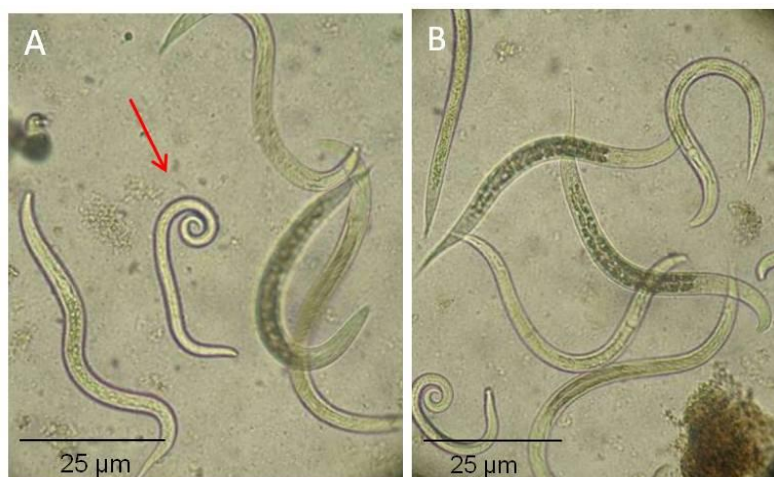


Figura 14 - A e B, Diferentes larvas obtidas através do processo de Sedimentação espontânea. Indicado por uma seta, na foto A, uma larva de *Angiostrongylus cantonensis* (400x).

#### 5.4 Obtenção de antígenos

A partir dos vermes adultos de *A. cantonensis*, *F. hepatica*, *A. lumbricoides*, *H. diminuta* e *T. canis* foram obtidos os antígenos utilizados, estes foram quantificados pelo kit Qubit da Invitrogen e está detalhado na tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de proteína encontrada em cada extrato bruto dos parasitos adultos.

Parasitos	Concentração de proteínas
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	5,68 mg/ml
<i>Fasciola hepatica</i>	5,48 mg/ml
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1,89 mg/ml
<i>Hymenolepis diminuta</i>	6,24 mg/ml
<i>Toxocara canis</i>	1,13 mg/ml



## 5.5 Eletroforese Bidimensional

Tiras de pH (3-10) imobilizadas em gel foram reidratadas com 90 $\mu$ g de antígeno de *A. cantonensis* e *F. hepatica* precipitados com TCA em acetona 20, e submetidas a eletroforese bidimensional com uma voltagem total de 35.300Vh, onde dois géis foram obtidos. Nota-se nas figuras 15 e 16, que há vários *spots* na mesma região no gel, cerca de 9 *spots* em *A. cantonensis*, e 14 em *F. hepatica*.

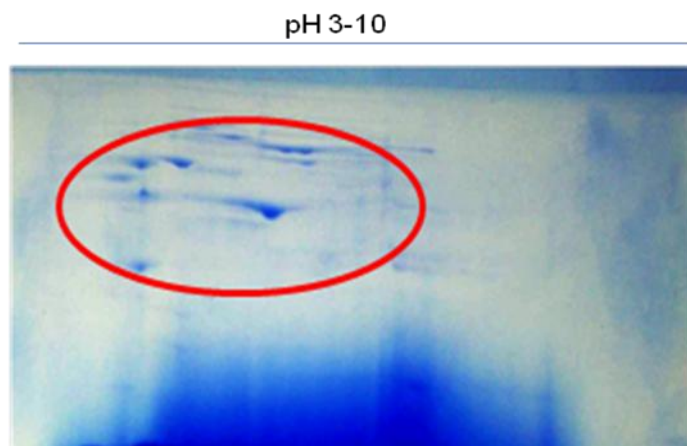


Figura 15: Gel Bidimensional de *Angiostrongylus cantonensis* utilizando 90 $\mu$ g de proteínas. Em detalhe, spots na região ácida do gel.

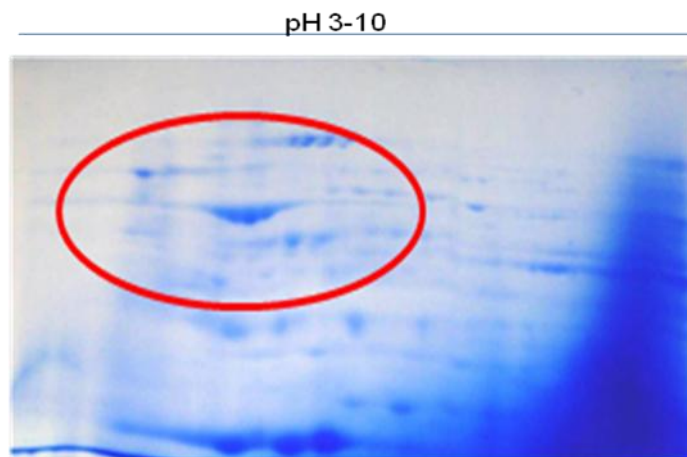


Figura 16: Gel Bidimensional de *Fasciola hepatica* utilizando 90 $\mu$ g de proteínas. Em detalhe, spots na região ácida do gel.



## 5.6 Eletroforese Unidimensional

Como um primeiro teste foi utilizado 5µg de antígeno bruto de cada parasito a fim de visualizar as proteínas no gel de poliacrilamida. Neste primeiro gel (Fig. 17), é possível visualizar várias bandas de proteínas entre 225kDa e 17kDa, sendo que na canaleta número 2, correspondente ao extrato de *Ascaris lumbricoides* as proteínas são distribuídas predominantemente nas regiões entre 76 e 225kDa.

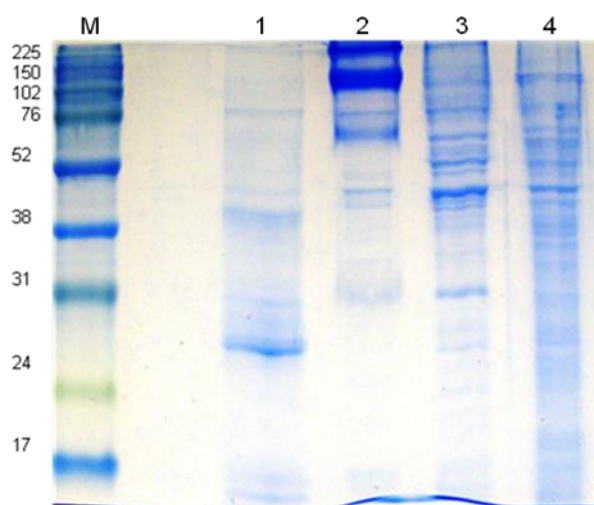


Figura 17: Gel unidimensional, utilizando 5µg de antígeno de cada parasito. 1 – *Fasciola hepatica*; 2 – *Ascaris lumbricoides*; 3 – *Hymenolepis diminuta*; 4 – *Toxocara canis*.

## 5.7 Western Blot

A figura 18 mostra os componentes que foram reconhecidos por soro contendo anticorpos anti - *A. cantonensis*, revelados por Western-blot após eletroforese unidimensional.

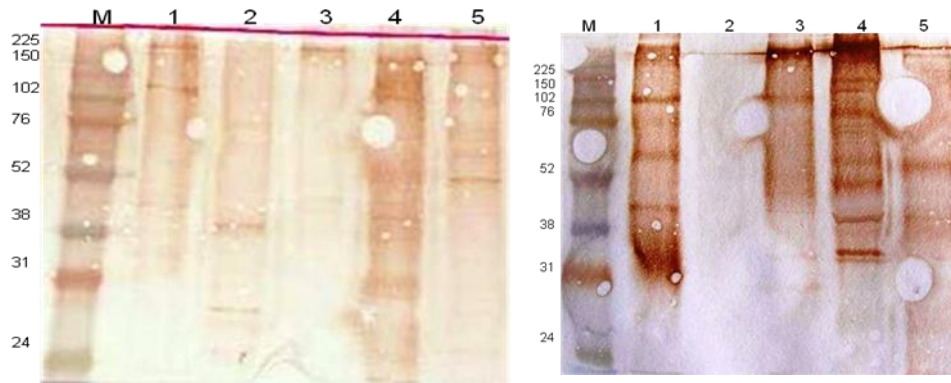


Figura 18: Western Blot mostrando a reatividade cruzada entre todos os grupos de parasitos reagindo contra soro positivo para angiostromilase, com as respectivas concentrações 0,5µg (esquerda) e 1µg (direita): 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

Nove bandas dos diferentes parasitos foram reconhecidas por Western Blot, recortadas dos géis de poliácridamida e submetidas à digestão por tripsina para identificação por espectrometria de massas. (Fig.19)

Na região de 52kDa todos os parasitos testados apresentaram alguma proteína de mesma massa molecular. *F. hepatica* e *H. diminuta* compartilharam uma região logo acima de 52kDa, assim como proteínas de baixo peso molecular, aproximadamente 15kDa.

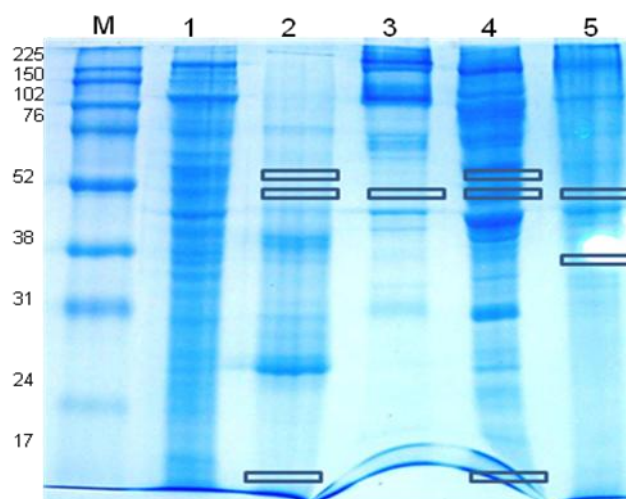


Figura 19: Gel unidimensional de poliácridamida mostrando as bandas compartilhadas com o soro positivo para Angiostromilases, que foram recortadas e submetidas a espectrometria de massas. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

Quando os alérgenos foram testados, o antígeno de amendoim apresentou compartilhamento na região acima da banda de 52kDa, na região de 38kDa mostrando duas bandas de maior intensidade, e também duas bandas entre as regiões de 24 e 31kDa. O antígeno de morango apresentou reconhecimento na região de 52kDa, assim como o antígeno de tomate onde pode-se visualizar reconhecimento na mesma região. (Fig. 20)

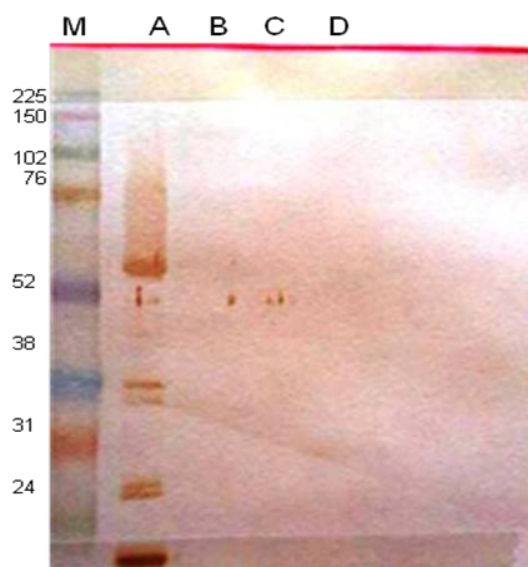


Figura 20: Western Blot mostrando a reatividade cruzada utilizando antígenos dos alérgenos contra soro positivo para Angiostrongilases. A – amendoim; B – morango; C – tomate; D – pólen.

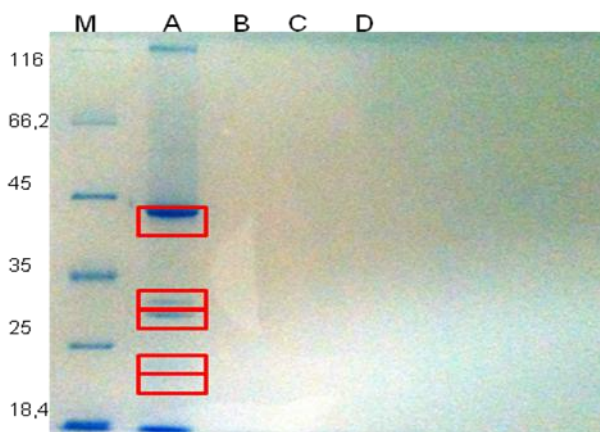


Figura 21: Gel unidimensional mostrando as bandas compartilhadas pelo soro de Angiostrongilases que foram recortadas e submetidas a espectrometria de massas. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.

Cinco bandas do alergeno amendoim foram comparadas com o Western Blot, recortadas do gel de poliacrilamida e submetidas à digestão por tripsina para serem identificadas por espectrometria de massas. (Fig. 21)

Portanto, nove bandas dos parasitos e cinco bandas dos alergenos foram recortadas dos géis e submetidas ao espectrômetro de massas, totalizando quatorze bandas. Na tabela 2 se encontra um quadro resumo das bandas e dos parasitos correspondentes.

Tabela 2: Resumo das bandas reconhecidas pelos parasitos e alergeno amendoim quando em contato com soro positivo para Angiostrongilíases.

Bandas	<i>F. hepatica</i>	<i>A. lumbricoides</i>	<i>H. diminuta</i>	<i>T. canis</i>	Amendoim
Entre 76 e 52kDa	X		X		X
52kDa	X	X	X	X	
38kDa				X	XX
Abaixo de 17kDa	X		X		
Entre 31 e 24 kDa					XX

Na eletroforese bidimensional e Western Blot utilizando antígenos dos parasitos *A. cantonensis*, *F. hepatica*, *A. lumbricoides*, *H. diminuta* e *T. canis*, somente as regiões ácidas foram reconhecidas pelo soro positivo de *Angiostrongylus* spp. com maior evidência. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e todos os extratos protéicos submetidos ao mesmo soro positivo para a Angiostrongilíase cerebral. (Fig. 22, 23, 24, 25 e 26)

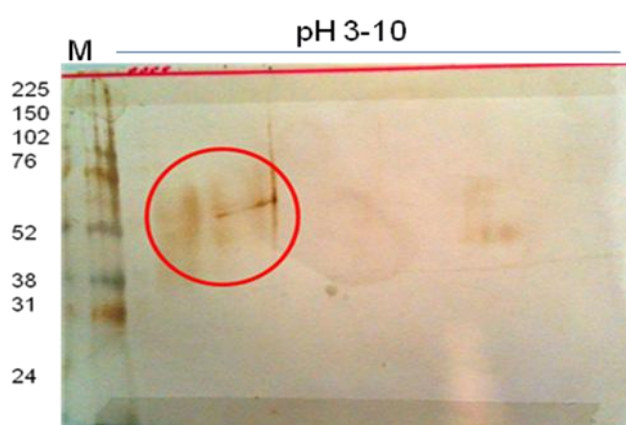


Figura 22: Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Toxocara canis* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase, sendo a região ácida a mais reconhecida pelo soro.

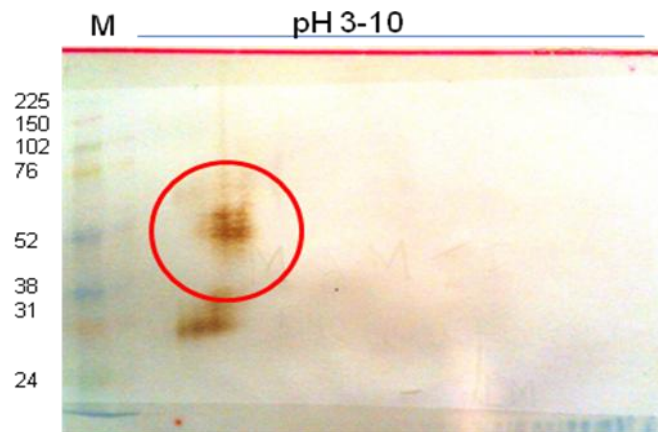


Figura 23: Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Angiostrongylus cantonensis* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase, sendo a região ácida a mais reconhecida pelo soro.

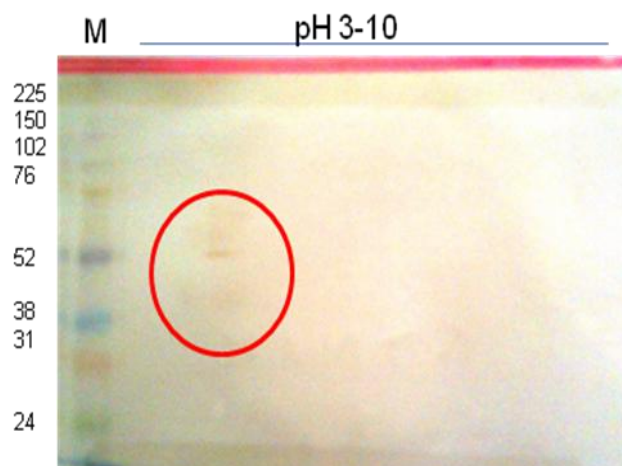


Figura 24: Western Blot utilizando 30µg de antígeno de *Ascaris lumbricoides* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíase, sendo a região ácida a mais reconhecida pelo soro.

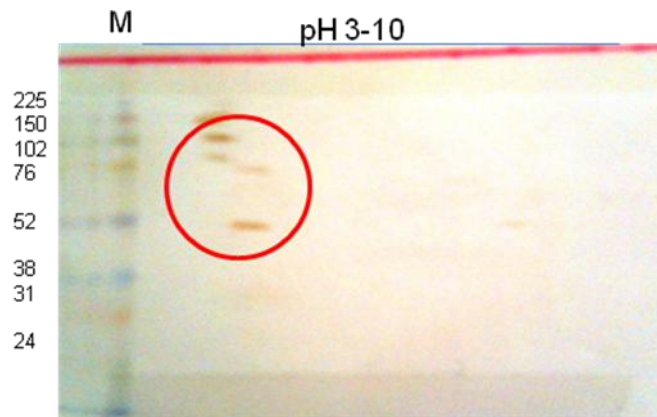


Figura 25: Western Blot utilizando 30 $\mu$ g de antígeno de *Fasciola hepatica* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíases, sendo a região ácida a mais reconhecida pelo soro.

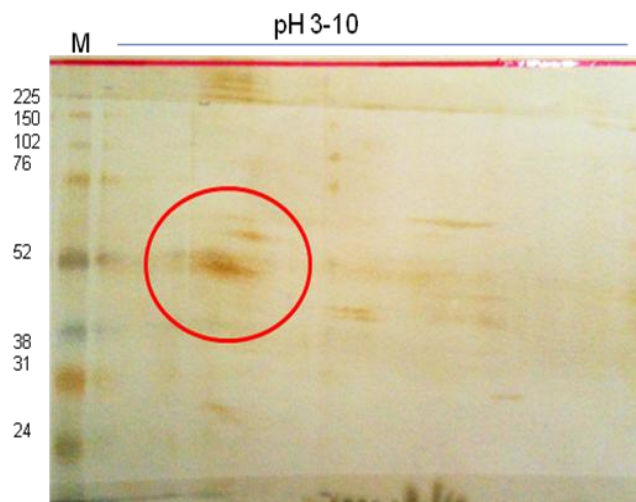


Figura 26: Western Blot utilizando 30 $\mu$ g de antígeno de *Hymenolepis diminuta* reagindo contra soro positivo para Angiostrongilíases, sendo a região ácida a mais reconhecida pelo soro.

Utilizando antígenos dos 4 tipos de alérgenos contra soro negativo para Angiostrongilíases, foi possível observar componentes reconhecidos no antígeno do morango nas regiões entre 102 e 76kDa, entre 76 e 52 kDa e 24kDa. (Fig. 27). Já utilizando os mesmos antígenos contra soro positivo para angiostrongilíase, houve reconhecimento intenso com o amendoim nas regiões 102 e 52kDa, 38kDa, entre 31 e 24kDa e uma forte banda abaixo de 24kDa. (Fig. 28)



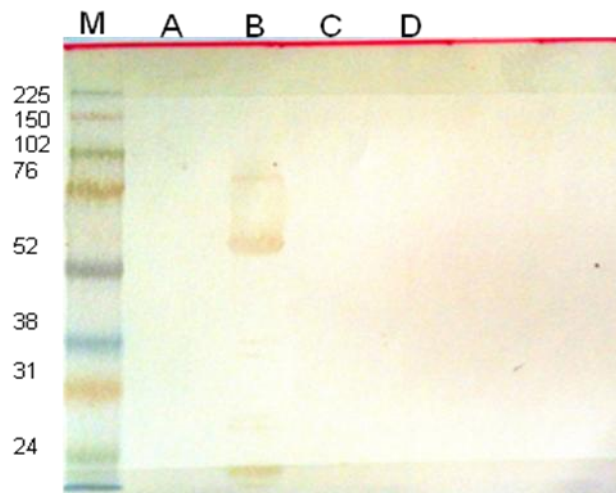


Figura 27: Western Blot utilizando 5 $\mu$ g antígeno dos diferentes alérgenos contra soro negativo para Angiostrongilíases. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.

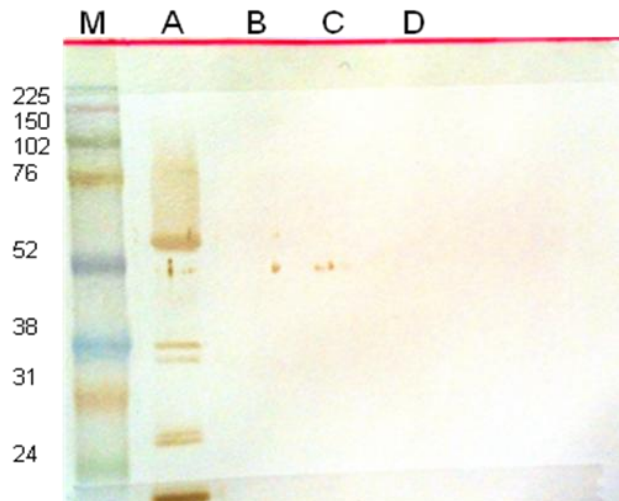


Figura 28: Western Blot utilizando 5 $\mu$ g antígeno dos diferentes alérgenos contra soro positivo para Angiostrongilíases. A – antígeno de amendoim; B – antígeno de morango; C – antígeno de tomate; D – antígeno de pólen.

A fim de se testar a memória imunológica de cada paciente, assim como a reatividade dos diferentes soros, foi realizada eletroforese unidimensional e Western blot utilizando antígenos dos diferentes parasitos, porém com diferentes soros positivos para as Angiostrongilíases, mostrando a reatividade cruzada em regiões e intensidades diferentes. (Fig.29 e 30)

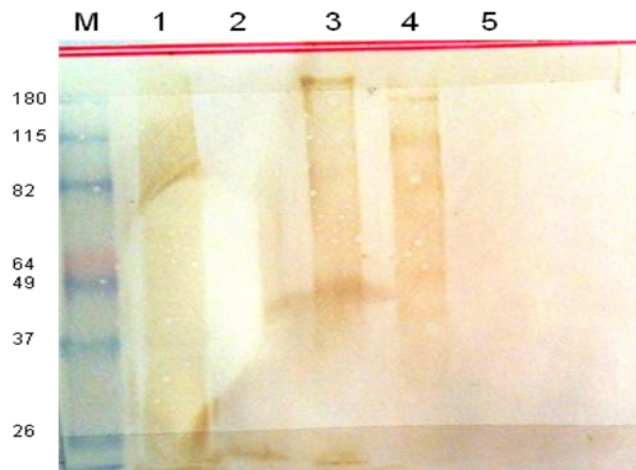


Figura 29: Western Blot utilizando 5 $\mu$ g de antígeno de todos parasitos contra soro positivo (1577) para *A.costaricensis*. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

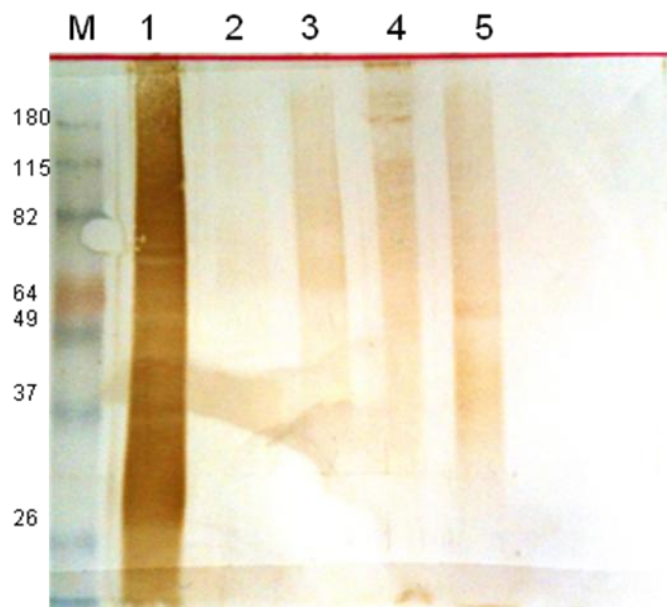


Figura 30: Western Blot utilizando 5 $\mu$ g de antígeno de todos parasitos contra soro positivo (1558) para *A.costaricensis*. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

Após a eletroforese unidimensional utilizando 5 $\mu$ g de cada antígeno, o gel obtido foi submetido a Western blot contra soro negativo para Angiostrongilíases. Na figura 31, bandas dos parasitos foram reconhecidas em várias regiões, sendo mais evidente na região de 52kDa, o mesmo não ocorreu com o antígeno de *T. canis*, onde nenhuma banda foi reconhecida (canaleta 5).



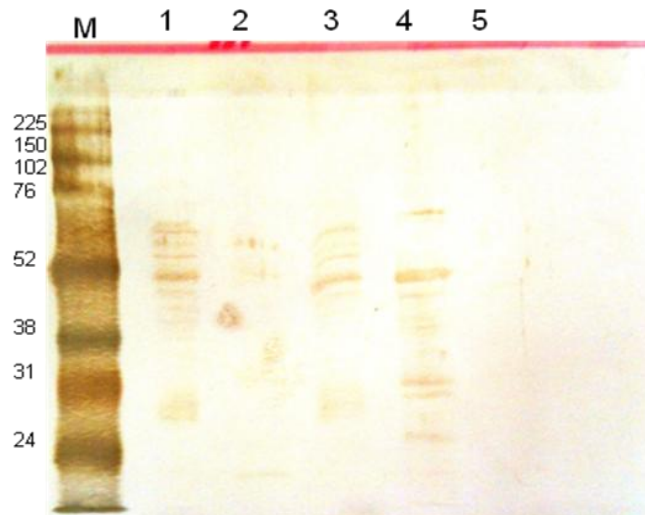


Figura 31: Western Blot utilizando 5 $\mu$ g de antígeno de todos parasitos contra soro negativo para Angiostrongilíases. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

Para análise de reatividade cruzada entre antígeno de amendoim e diferentes soros positivos para Angiostrongilíases, experimentos de Western-blot foram realizado (Fig. 32). Cerca de 50 $\mu$ g de antígeno de amendoim e soro de cada paciente positivo foram utilizados. Cada soro foi adicionado a uma canaleta e a revelação da reação foi feita através de incubação com DAB (diaminobenzidina) e adição do substrato da enzima, peróxido de hidrogênio 0,015% em PBS. Pode-se notar que as regiões de 64kDa e região abaixo de 19kDa, foram as que demonstraram mais reação cruzada.

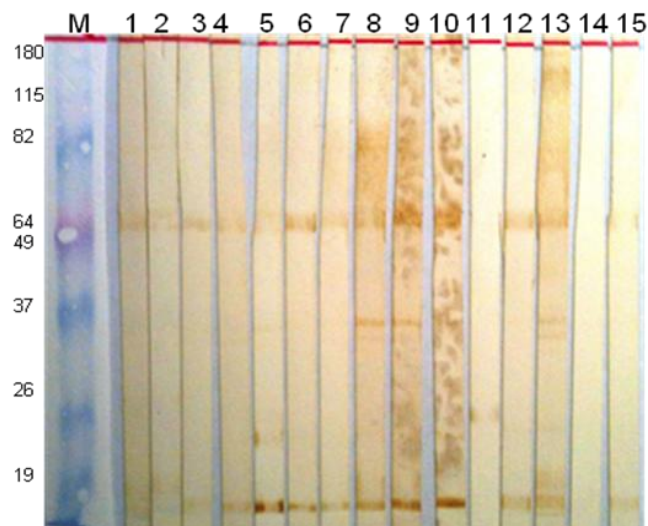


Figura 32: Western Blot utilizando 50 $\mu$ g de antígeno de amendoim e 15 diferentes soros positivos para Angiostrongilíases.

## 5.8 Espectrometria de massas e identificação de proteínas

A partir de nove componentes provenientes dos géis contendo antígenos dos parasitos e 5 componentes provenientes dos géis de alérgenos, quatorze bandas foram reconhecidas. Destas, onze diferentes proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT (tabela 3). Os peptídeos obtidos a partir das bandas 4, 9, 10, 11 não apresentaram homologia com as proteínas depositadas no banco de dados utilizados para a pesquisa.

Na banda 1, antígeno de *H. diminuta* foram encontradas as proteínas Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase e Proteína de Choque Térmico 70 (HSP70). Na banda 2, antígeno de *H. diminuta* foram encontradas as proteínas Hipotética DAPPUDRAFT e Chaperonina 5 60 kDa. Na banda 3, antígeno de *F. hepatica* foi encontrada a proteína HSP70. Na banda 5, antígeno de *H. diminuta* foi encontrada a proteína Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase. Na banda 6, antígeno de *F. hepatica* foi encontrada a proteína Cadeia A sigma classe GST. Na banda 7, antígeno de *A. lumbricoides* foram encontradas as proteínas Glucose-6-Fosfato Isomerase, Piruvato Desidrogenase subunidade E1 e Glutamato Desidrogenase 2. Na banda 8, antígeno de amendoim foi encontrada a proteína arachin Ahy-1. Nas bandas 12, 13 e 14, antígeno de amendoim, foram encontradas as proteínas Full=Allergen Ara h 1 clone P41B , proteína Gly1 e Piruvato desidrogenase subunidade E1. Cada distância percorrida pela banda no gel foi medida a partir do ponto de partida de migração correspondente ao reconhecimento destas bandas no Western Blot pelo soro positivo para Angiostrongilíases e está detalhada na tabela 4.

Foram utilizados como parâmetros de escolha de peptídeos aqueles com os três maiores scores, ou então aquelas proteínas que continham peptídeo único.

Tabela 3: – Identificação de proteínas que foram recortadas dos géis de eletroforese unidimensional, submetidas a digestão por tripsina e analisadas por espectrometria de massas.

Bandas	Sequência do Peptídeo	Nome da proteína (massa)	Organismo	Score
Banda Y-P (HD) 1	K.FVCAAFPSACGK.T	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (55577)	<i>Echinococcus multilocularis</i>	411
	K.VINNWPENPEK.T			
	R.RPEGIPLVYEAR.T			
	R.LIMSGSGYGGNSLLGK.K			
	R.AINPEAGFFGVAPGTNHK.T			
	K.WEDPAGVPSVFMFGGR.R			
Banda P (HD) 2	K.RNTTPTK.Q	Proteína de Choque Térmico 70 - HSP70 (72851)	<i>Echinococcus granulosus</i>	370
	R.TTPSYVAFTDTER.L			
	K.NQVAMNPTNTVFDK.R			
	K.STAGDTHLGGEDFDSR.L			
	R.IINEPTAAAIAYGDKK.V			
Banda P (HD) 2	R.ILGLDGLGAYGMGIFVVK.L	Proteína Hipotética DAPPUDRAFT (304467)	<i>Daphnia pulex</i>	100
	K.LVIEVAQKTSDLAGDGTITATVLR.A	Chaperonina 5 60 kDa (57684)	<i>Rhodopirellula baltica SH1</i>	87
Banda Y-P (FA) 3	R.ARFEELNADLFR.S	Proteína de Choque Térmico 70 - HSP70 (70951)	<i>Fasciola gigantica</i>	399
	R.TTPSYVAFTDTER.L			
	R.QATKDA GAISGLNVL.R.I			
	R.IINEPTAAAIAYGDKK.K			
	K.VTDAVVTVPAYFNDSQR.Q			
K.SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK.S				
Banda P (FA) 4	QUERATINA			
Banda B (HD) 5	R.TAAQNIPASTGAAK.A	Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase (36298)	<i>Spirometra erinaceieuropaei</i>	67
Banda B (FA) 6	R.VPLLDVTFPGDK.L	Cadeia A Sigma Classe GST (24690)	<i>Fasciola Hepatica</i>	183
	K.MVGETDEEYYLIER.I			
Banda P (AS) 7	K.HFVALSTNGPK.V	Glucose-6-Fosfato Isomerase (64225)	<i>Ascaris suum</i>	420
	K.LLEGASLVDEHFLK.A			
	K.TFTTQETITNAESAK.E			
	R.FAAYFQQDMESNGK.F			
	K.FSLQLDTADGPILFDYSK.N			
	R.NVSDKPTVDGQNV TADV.NK.V			
Banda P (AS) 7	K.IINELEGIFEGAGWNVIK.V	Piruvato Desidrogenase subunidade E1 (99948)	<i>Escherichia coli O 157:H7 str. EDL933</i>	233
	K.DYGVGSDVYSVTSFTELAR.D			
	K.YPETAALVADWTDEQIWALNR.G			
	K.VQIEPNSELLSR.T			
Banda P (AS) 7	K.VIAEANGPTTAAEK.I	Glutamato Desidrogenase 2 (55726)	<i>Ascaris suum</i>	171
	R.TGITSEEEIVSSALEY SMQR.S			
Banda B (AM) 8	K.TANELNLLILR.W	arachin Ahy-1 (61810)	<i>Arachis hypogaea</i>	1146
	R.SPDIYNPQAGSLK.T			
	R.QQPEENAQQFQR.L			
	R.FNLAGNHEQEFLR.Y			
	R.GENESDEQGAIVTVR.G			
	R.RFNLAGNHEQEFLR.Y			
R.FQGQDQSQQQDSSHQK.V				

Bandas	Sequência do Peptídeo	Nome da proteína (massa)	Organismo	Score
	R.RPFYSNAPQEIFIQQGR.G			
	R.QILQNLRGENESDEQGAIVTVR.G			
	R.GYFGLIFPGCPSTYEPPAQQGR.R			
	R.IESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSR.L			
	R.IESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSR.L			
	R.AGQEQENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDR.Q			
Banda B (TX) 9	nada			
Banda P (TX) 10	nada			
Banda L-V (AM) 11	nada			
Banda P (AM) 12	R.EREEDWR.Q	Full=Allergen Ara h 1, clone P41B (71701)	<i>Arachis hypogaea</i>	1735
	K.LFEVKPDKK.N			
	K.GTGNLELVAVR.K			
	R.NNPFYFPSR.R			
	R.SSENNEGVIVK.V			
	R.QFQNLQNH.R.I			
	K.SFNLDDEGHALR.I			
	R.GRQPGDYDDR.R			
	K.VSKEHVEELTK.H			
	K.EGALMLPHFNSK.A			
	K.DLAFFGSGEQVEK.L			
	R.IPSGFISYILNR.H			
	R.KSFNLDDEGHALR.I			
	R.EGEQEWGTPGSHV.R.E			
	R.VLLEENAGGEQEER.G			
	K.GSEEEGDITNPINLR.E			
	R.IVQIEAKPNTLVLPK.H			
	R.NTLEAAFNAAFNEIR.R			
	K.KGSEEEGDITNPINLR.E			
	R.IFLAGDKDNVIDQIEK.Q			
	R.EEEEEDEEEEEGSNR.E			
	R.NTLEAAFNAAFNEIR.R			
	R.EEEEEDEEEEEGSNR.E			
	K.NPQLQDLDMMLTCVEIK.E			
	K.ISMPVNTPGQFEDFFPASSR.D			
Banda B (AM) 13	R.QQPEENACQFQR.L	Gly1 (60754)	<i>Arachis hypogaea</i>	413
	R.FNLAGNHEQFLR.Y			
	R.GENESEEEGAIVTVK.G			
	R.RPFYSNAPQEIFIQQGR.G			
	R.GYFGLIFPGCPSTYEPPAQQGR.R			
	R.AGQEQENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDR.Q			
Banda V-L (AM) 14	K.IINELEGIFEGAGWNVIK.V	Piruvato Desidrogenase subunidade E1 (99948)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933	297
	K.LIQLMNETVDGDYQTFK.S			
	K.DYGVGSDVYSVTSFTELAR.D			

Tabela 4: Distância percorrida pela banda no gel de poliacrilamida a partir do ponto de partida de migração do gel, correspondente ao reconhecimento destas bandas no Western Blot pelo soro positivo para Angiostrongilíases.

<b>Bandas</b>	<b>Distância da banda</b>
1	2 cm
2	2,7 cm
3	2 cm
4	2,7 cm
5	5,5 cm
6	5,5 cm
7	2,7 cm
8	4 cm
9	3,7 cm
10	2,7 cm
11	4,9 cm
12	2,3 cm
13	4 cm
14	5 cm

## 5.9 Reconhecimento de HSPs

Durante a identificação das proteínas, foram identificadas proteínas de choque térmico (HSP70) em *Hymenolepis diminuta* e *Fasciola hepatica*. A fim de se verificar a presença de HSPs na região de reconhecimento pelo anticorpo foi feito eletroforese unidimensional e Western Blot utilizando diferentes concentrações de antígenos de todos os parasitos reagindo contra anti-HSP70. Na figura 33, onde foi utilizado 5µg de antígeno podemos visualizar o reconhecimento do extrato protéico de *A. cantonensis* em uma concentração em quase todas as regiões, sendo bem evidente entre as regiões de 64 e 82kDa, onde HSP70 se encontra. Já na figura 34, utilizando 10µg de antígeno o reconhecimento de *A.cantonensis* se manteve, porém com mais evidência, compreendendo todos os pesos moleculares. Também foi observado reconhecimento de *F. hepatica* e *T. canis* entre as regiões de 64 e 82kDa.

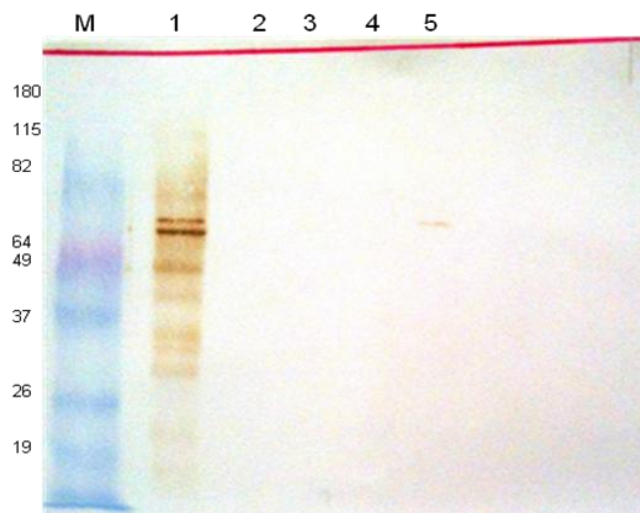


Figura 33: Western Blot utilizando 5µg de antígeno de todos os parasitos contra anti - HSP70. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

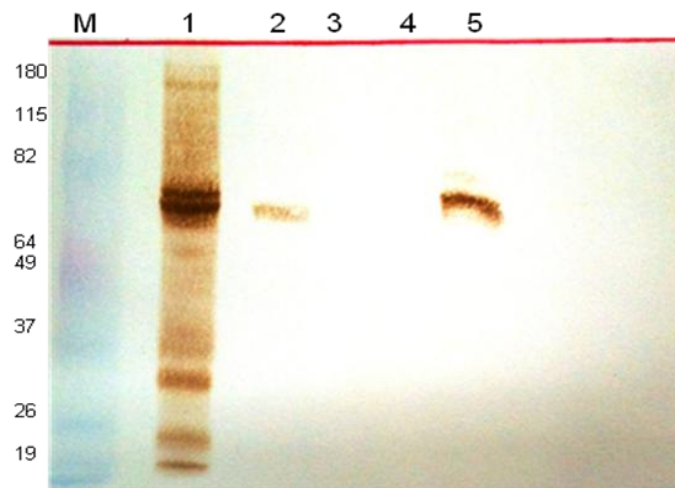


Figura 34: Western Blot utilizando 10 $\mu$ g de antígeno de todos parásitos contra anti - HSP70. 1 – *Angiostrongylus cantonensis*; 2 – *Fasciola hepatica*; 3 – *Ascaris lumbricoides*; 4 – *Hymenolepis diminuta*; 5 – *Toxocara canis*.

## 6. DISCUSSÃO

A dificuldade no diagnóstico das angiostrongilíases, abdominal e cerebral, se deve ao fato de não ocorrer eliminação de formas parasitárias (ovos/larvas) nas fezes, portanto, testes moleculares se tornam essenciais para elaboração de diagnósticos para essas parasitoses. O grande desafio encontrado nos testes moleculares é a busca por especificidade. A interação antígeno-anticorpo, quando consideramos epitopos e sequências hipervariáveis das imunoglobulinas, é tida como 100% específica, ou seja, determinado epitopo somente se liga a determinada sequência do anticorpo. Porém, epitopos antigênicos podem ser compartilhados entre diferentes organismos o que produz reações cruzadas reduzindo a especificidade de testes imunodiagnósticos. Muitos relatos na literatura já descreveram essa reatividade, porém são poucos os estudos que identificam e analisam detalhadamente estas moléculas compartilhadas.

A reatividade cruzada entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis* com outros helmintos já foi relatada em ensaios de detecção de anticorpos em indivíduos infectados com diversos parasitos. Chen e colaboradores (2011) relataram essa reação cruzada com *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma japonicum*, *Paragonimus westermani*, *Clonorchis sinensis*, *Echinococcus granulosus*, *Spirometra erinacei*, *Taenia solium*. Vitta e colaboradores (2010) demonstraram reatividade cruzada com *Gnathostoma sp*, *Wuchereria bancrofti*, *Paragonimus westermani*, *Opisthorchis viverrini*. Dekumyoy e colaboradores (2000) obtiveram em seus experimentos casos de reatividade cruzada com *Strongyloides spp.*, *Toxocara spp.*, além de outros já citados. Nuamtanong e colaboradores (1996) demonstraram reatividade cruzada com *Trichinella spiralis*, *Trichuris spp.* e *Opisthorchis spp.* Eamsobhana e colaboradores (1998) mostraram reatividade cruzada entre o extrato bruto de *A. cantonensis* com *Gnathostoma spinigerum*, um parasito que causa patologia clinicamente semelhante ao que acontece com a infecção humana por *A. cantonensis*. Além disso, co-infecções por helmintos em humanos é comum em regiões tropicais no mundo todo, onde a transmissão por geo-helmintos muitas vezes ocorre simultaneamente. (Buck et al, 1978, Petney & Andrews, 1998) Geiger, e colaboradores (2011), estudaram a relação do parasito *Necator americanus* e a co-infecção por helmintos, demonstrando que a co-infecção crônica causada por espécies de nematódeos e trematódeos consideravelmente altera a resposta imune a antígenos brutos de ancilostomídeos.

Os testes imunológicos e moleculares para a detecção de anticorpos provaram ser úteis para estudos epidemiológicos por um longo período de tempo. (Agudelo-



Florez et al, 2009; Eamsobhana & Yong, 2009; Nkouawa et al, 2010; Chen et al, 2011). No entanto, estes métodos possuem limitações na medida em que não se torna possível detectar várias infecções parasitárias aplicando apenas uma técnica. *Strongyloides* spp. e *Ascaris lumbricoides*, por exemplo, são parasitos disseminados no mundo inteiro, onde milhões de pessoas se encontram infectadas, e especialmente no caso das estrogiloidíases onde grande parte dos casos são assintomáticos. Portanto, muitas pessoas possuem anticorpos contra esses helmintos. Este dado se revela um problema quando testes de padronização de antígenos são feitos, e indivíduos que já possuem anticorpos para determinadas parasitoses são ditos como indivíduos com soro negativo.

Chen e colaboradores (2012) desenvolveram uma metodologia baseada em microarranjo de uma plataforma para triagem populacional de parasitoses como cisticercose, triquinose, paragonimíases, esparganoses e angiostrongilíases, consideradas doenças tropicais, e compararam com teste de ELISA tradicional. Os resultados indicaram que os diferentes parasitos provavelmente possuem antígenos específicos para o diagnóstico, portanto, eles podem ser utilizados para a detecção específica e diferencial. Por exemplo, proteínas do cisticerco de *Taenia solium* ou de *Cysticercus cellulosae* com peso molecular de 100,95 ou 26kDa podem ser utilizadas no teste confirmatório de casos de neurocisticercose (Chen et al, 2012). Já o antígeno de 98kDa, seria um candidato para o uso no diagnóstico das Angiostrongilíases. Porém, se sabe que esses antígenos específicos se tornam cada vez mais difíceis de serem detectados a medida que estudos de reatividade cruzada crescem e demonstram o compartilhamento de moléculas.

Lescano e colaboradores (2012), demonstraram a resposta humoral de ratos infectados com *Toxocara canis*, e co-infectados com *Ascaris suum*, *Taenia crassiceps*, *Schistosoma mansoni*, *Strongyloides venezuelensis* ou *Toxoplasma gondii*, demonstrando reatividade cruzada entre *T. canis* e *A. suum*. Lynch e colaboradores (1988), mostrou essa mesma reatividade cruzada ocorrendo com humanos na Venezuela.

No presente estudo, objetivou-se estudar a reatividade cruzada e a identificação das moléculas compartilhadas entre *A. cantonensis* com *Strongyloides* spp., *Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis diminuta* e *Toxocara canis*, assim como os alérgenos amendoim, morango, tomate e pólen. Para que fosse atingida uma maior variedade de grupos taxonômicos, os parasitos escolhidos para o teste da reatividade cruzada abrangem cestódeos, trematódeos e nematódeos.

Inicialmente, se tentou coletar larvas de *Strongyloides* spp., provenientes de ratazanas naturalmente infectadas, a fim de se obter vermes adultos para a extração

de antígenos. Algumas ratazanas foram capturadas e suas fezes processadas e submetidas aos métodos de sedimentação espontânea e método de Baerman (Baermann, 1917). A análise do material fecal dessas ratazanas, por microscópio óptico, mostrou a variedade de organismos que podem parasitar um único indivíduo. O poliparasitismo vinculado a co-infecção parasitária pode ser um dos fatores que desencadeiam resposta de reatividade cruzada, como já visto em trabalhos citados anteriormente.

Nas análises das fezes obtidas, se observou larvas de *A. cantonensis* e das artérias pulmonares da ratazana vermes do parasito. Esta descoberta é de grande importância para saúde pública no país, já que não havia sido relatado anteriormente infecções por *A. cantonensis* no Rio Grande do Sul. Carvalho e colaboradores (2012) investigaram a presença de *A. cantonensis* em portos da costa brasileira, inclusive o porto de Rio Grande, onde não foi encontrado nenhum caso de hospedeiro intermediário infectado. Até então, dois casos de doença humana haviam sido relatados (Caldeira et al, 2007; Lima et al, 2009) e mais quatro casos de hospedeiros intermediários contendo o parasito. (Teles et al, 1997; Neuhauss et al, 2007; Simões et al, 2011; Maldonado et al, 2010; Moreira et al, 2012). Estes dados se tornam muito importantes porque demonstram a expansão da área de ocorrência, agora atingindo o extremo sul do país.

Os parâmetros utilizados para identificação das larvas de *A. cantonensis* não se aplicam as características das larvas de *Strongyloides* spp. e ancilostomídeos. Estes dois últimos parasitos possuem fases larvais distintas até o desenvolvimento dos vermes adultos. Essas fases possuem muitas semelhanças entre as duas espécies, e detalhes minuciosos que discriminam uma da outra, por exemplo: larvas rabditóides (L1) com esôfago rabditóide curto em *Strongyloides* spp. e longo em ancilostomídeos, e as larvas filarióides (L3) infectantes com cauda afilada em ancilostomídeos e bifurcada em *Strongyloides* spp. (Rey, 1991). O tempo de desenvolvimento larval é crucial na identificação de ambas as espécies uma vez que podem apresentar características morfológicas semelhantes. Apesar de estas características diferenciarem as espécies, a discriminação de cada estágio larval é muito complexa.

Durante a eletroforese unidimensional, bidimensional e Western-blot foi possível identificar spots imunogênicos na região ácida dos géis de *A. cantonensis*, *F. hepatica*, *A. lumbricoides*, *H. diminuta* e *T. canis*. Morassuti et al, 2011 isolaram e identificaram as proteínas encontradas na região de 31kDa de extrato bruto de *A. cantonensis*, e que interessantemente também se encontravam nesta mesma região ácida.

Muito além das moléculas que podem ser compartilhadas por organismos

parasitos que conferem reatividade cruzada, estão as moléculas que também desencadeiam uma resposta de hipersensibilidade, tais como alérgenos, portanto também foram utilizados antígenos de amendoim, morango, tomate e pólen. Todos os processos envolvendo os diferentes antígenos foram realizados utilizando diferentes concentrações de antígenos para titulação do mesmo aplicado ao gel. Muitos testes de diagnóstico quando desenvolvidos, não levam em consideração o aspecto de concentração de antígenos utilizado e acabam sendo específicos para determinado antígeno. No entanto, quando são testados com diferentes antígenos não relacionados, como, por exemplo, alérgenos, acabam demonstrando o mesmo reconhecimento. Portanto, o que antes era específico para uma parasitose, na verdade é uma proteína, ou banda compartilhada por outros helmintos ou mesmo outra molécula que gera reação imunológica.

No primeiro teste de eletroforese unidimensional utilizando extrato de todos os parasitos, foi possível visualizar muitas bandas se concentrando na mesma região, com pesos moleculares similares. Portanto, essas bandas foram incubadas com soro positivo para Angiostrongilíases através de Western Blot, para se identificar quais seriam compartilhadas com *Angiostrongylus*. spp. Praticamente todas as regiões dos diferentes parasitos foram reconhecidas pelo soro; o que já se esperava, tendo em vista que organismos geneticamente e evolutivamente mais relacionados compartilham epitopos idênticos e que, portanto compartilham algumas moléculas imunogênicas (Kuby, 2008). Este reconhecimento inespecífico pode gerar resultados falsos e dificultar o diagnóstico. As concentrações dos antígenos foram modificadas ao longo dos testes, a fim de se testar até que medida tal antígeno era realmente reconhecido por determinado anticorpo, ou então o simples fato de haver acúmulo de proteínas seria o suficiente para haver reconhecimento. A diversidade de antígenos que cada indivíduo entra em contato durante a vida seja viral, bacteriano, parasitário ou por alérgenos é muito grande e variada, até mesmo a diversidade genética de cada população humana pode influenciar, já que diferentes regiões podem ter variações nas suas respostas imunológicas. Além disso, a memória imunológica de cada indivíduo varia muito, o que pode ser imunogênico para um organismo, pode não ser para outro. Isto pode ser observado nos resultados obtidos nas figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32.

Foram recortadas dos géis quatorze bandas, onde foi possível identificar onze diferentes proteínas dos parasitos e alérgenos reconhecidas pelo soro das Angiostrongilíases, confirmando assim a hipótese do compartilhamento de antígenos. Sabendo que as informações relacionadas à sequência de genes de *A. cantonensis* são ainda muito limitadas, a identificação das respectivas proteínas foi baseada em resultados para proteínas homólogas de organismos relacionados.

Das proteínas identificadas, proteína de choque térmico 70 (HSP70), Classe sigma GST e proteína Full=Allergen Ara h 1, destacam-se por já terem sido referidas como imunogênicas.

HSP70 foi reconhecida na região de 52kDa no antígeno de *F. hepatica*, e apresenta sequência de peptídeos iguais ao de *Fasciola gigantica*, um trematódeo do mesmo gênero e que provavelmente possuem uma história evolutiva muito semelhante. HSPs (*heat shock proteins*) são proteínas altamente conservadas ao longo da evolução e estão presentes em ambos os organismos eucarióticos e procarióticos. (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Essas proteínas são agrupadas em diferentes famílias com base nas suas massas moleculares, e desempenham papel de chaperonas, auxiliando no dobramento adequado de proteínas recém-sintetizadas. Essa proteína tem sido também identificada em produtos de secreção e excreção de muitos parasitos, incluindo *A. cantonensis* (Morassutti et al, 2011), além de ter sido relatada na ativação de macrófagos, e de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias durante infecção in-vitro por *Trypanosoma carassi*. (Oladiran & Belosevic, 2009). HSP70 também foi encontrada em soro de pacientes infectados com *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosos* e *T. carassi* (Kanamura et al, 2002; Ortona et al, 2003; Oladiran & Belosevic, 2009), sugerindo que a HSP70 de *A. cantonensis* também pode estar envolvido na estimulação imune, produção de citocinas e patogênese como reportado em *T. carassi*.

A proteína GST classe sigma foi reconhecida na região próxima de 17kDa, e possui sequência de peptídeos igual ao de *Fasciola hepatica*. A análise de enzimas purificadas de GSTs já foi identificada em vários parasitos, tais como *Taenia solium* (Vibanco-Pérez et al, 1999), *H. polygyrus* (Brophy et al, 1994) e *Fasciola hepatica* (Chemale et al, 2006). A identificação e caracterização destas enzimas se torna importante no entendimento dos mecanismos de evasão do sistema imune dos parasitos, já que estas proteínas possuem papel importante na defesa contra resposta de estresse oxidativo. GSTs já foram selecionadas como alvos para o imunodiagnóstico (Cheng et al, 2007), e uma GST de *A. costaricensis* foi identificada como um potencial antígeno, podendo ser usada no diagnóstico de *A. costaricensis* no Western-blot (Abraham et al, 2004) e também encontrada em *A. cantonensis*, mas sem comprovação de ser uma proteína imunogênica. (Morassutti et al, 2011).

Proteína Full=Allergen Ara h 1 foi reconhecida na região de 52kDa do amendoim e compartilha quase todos os peptídeos deste alérgeno. O amendoim é um dos alimentos que mais causam alergias no mundo todo. Apesar da severidade das reações alérgicas que este alimento pode causar, e o aumento da prevalência dessa alergia em crianças e adultos, ainda não há cura. (Sicherer & Sampson, 2007).

Bashir, et al 2002, através de experimento induzindo infecção parasitária de helmintos em camundongos e alimento-os com amendoim, constataram que a infecção gerou uma proteção contra a alergia causada pelo alimento, que envolveu mecanismos imunorreguladores bloqueando IgE específicos do alérgeno.

Tendo em vista a relação das infecções parasitárias com doenças alérgicas, os resultados obtidos neste trabalho, através da identificação das proteínas compartilhadas entre *Angiostrongylus*. Spp e amendoim são dados importantes para fomentar uma melhor compreensão da alergenicidade de moléculas de helmintos.

Em conclusão, os dados deste trabalho reforçam a importância do conhecimento detalhado da reatividade cruzada, demonstrando e identificando várias proteínas de outros organismos que são reconhecidas pelos anticorpos de indivíduos infectados com metastrongilídeos.

Quanto aos epitopos compartilhados entre diferentes organismos, outras possibilidades de aproveitamento da reatividade cruzada permanecem como perspectivas: **a)** a remoção destes epitopos ou dos anticorpos que os reconhecem, na busca de testes imunodiagnósticos mais específicos; **b)** a utilização de antígenos heterólogos em situações onde determinado organismo é de difícil obtenção; **c)** proteção cruzada como estratégia de vacinação. Estas perspectivas também representam oportunidade para melhor conhecer, de forma geral, a interação parasito-hospedeiro e as relações filogenéticas na diversidade dos seres vivos.

## REFERÊNCIAS

- Aalberse R.C. Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: 228-238.
- Abraham, SE. Schulz-Key, H. Geiger, SM. Caracterización de antígenos de bajo peso molecular de *Angiostrongylus costaricensis*, reconocidos durante uma infección experimental em roedores. *Parasitología Latinoamericana.* 2004; 59: 8-13.
- Agostini, AA, Marcolan, AM, Lisot, JMC, Lisot, JUF. Angiostrongiliase abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1984; 4: 443-445.
- Agudelo-Florez, P. Palacio, LG. Dot Blot for the diagnosis of porcine cysticercosis. *Rev Sci Tech.* 2009; 28(3): 1077-1084.
- Aguiar, PH. Morera, P. Pascual, J. First Record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30(5): 963-5
- Alicata, JE. Incapability of Vertebrates to Serve as Paratenic Host for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J.Parasitol.* 1963a; 49: 48.
- Alicata, JE. Pigs and Calves as Carrier Hosts for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J. Parasitol.* 1964; 50: 39.
- Alicata, JE. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv Parasitol.*1965; 3: 223-248.
- Arakaki,T. Iwanaga, M. Kinjo, F. Saito, A. Asato, R. Ikeshiro, T. Efficacy of Agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol.* 1990; 76: 425-428.
- Ayala, MAR. Angiostrongiloidíase Abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1982; 77:189-193.
- Baermann, G. Eine eifache Mathode Zur Auffindung von Anklyostomum (Nematoden) larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned. –Indie.* 1917; 57: 131-137.
- Barbosa, H. Raick, AN. Magalhães, AV. & Otero, PMF. Angiostrongilose Abdominal. *Rev. Ass. Med. Bras.* 1980: 26: 178-180.
- Baek, B-K. et al. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. *The Korean journal of Parasitology.*1998; 36: 99-107.
- Bashir, MEH. Andersen, P. Fuss, IJ. Shi, HN. Anderson, CN. An Enteric Helminth Infection Protects Against an AllergicResponse to Dietary Antigen. *The Journal of Immunology.* 2002; 169(6):3284-92.
- Ben, R. Rodrigues, R. Agostini, AA. Graeff-Teixeira, C. Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by na enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(7): 914-917.

- Bhaibulaya, M. Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1991; 22:189-93
- Brophy, PM. Ben-Smith, A. Brown, A. Behnke, JM. Pritchard, DI. Glutathione S-transferases from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular Biology. 1994; 109: 585-592
- Buck, AA. Anderson, RI. Mac Era, AA. Epidemiology of poly-parasitism. I. Occurrence, frequency and distribution of multiple infections in rural communities in Chad, Peru, Afghanistan and Zaire. Tropenmed Parasitol. 1978; 29: 61-70.
- Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Walter S Lima. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 887-889
- Carrada-Bravo, T. *Strongyloides stercoralis*: Ciclo vital, cuadros clínicos, epidemiología, patología, y terapéutica. Rev Mex Patol Clin. 2008; 55: 88-110.
- Carvalho OS, Scholte RG, Mendonça CL, Passos LK, Caldeira RL. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour áreas in Brazil. Mem Int Oswaldo Cruz 2012; 107(6): 740-746.
- Céspedes, R. Salas, J. Mekbel, S. Troper, L. Müllner, F. & Morera, P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). Acta Méd. Costaric. 1967; 10: 235-255.
- Chemale, G. Morphew, R. Moxon, JV. Morassutti, AL. Lacourse, EJ. Barret, J. Johnston, DA. Brophy, PM. Proteomic analysis of glutathione S-transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. Proteomics. 2006; 6: 6263-6273.
- Chen, JX. Chen, MX. Ai, L. Chen, JH. Chen, SH. Zhang, YN. Cai, YC. Zhu, XQ. Zhou, XN. A protein microarray for the rapid screening of patients suspected of infection with various food-borne helminthiases. Plos Negl Trop Dis. 2012; 6(11): 1889
- Chen, M. et al. Development of a double antibody sandwich ELISA assay for the diagnosis of angiostrongyliases. Journal of Parasitology. 2011'
- Cheng, PC. Tsaihong, JC. Lee, KM. Application of recombinant Sjc26GST for serodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in water buffalo (*Bos buffelus*). Veterinary Parasitology. 2007; 150: 314-320
- Choi, D. Lim, JH. Choi, DC. Lee, KS. Paik, SW. Kim, SH. Choi, YH. Huh, S.. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. Korean J. Parasitol. 2012; 50: 23-27.
- Collier, L. Balows, AS. Max. Topley & Wilson's : Microbiology and Microbial Infections. 1998; 701.
- Conway, DJ. Atkins. NS. Lillywhite, JE. Bailey, JW. Robinson, RD. Lindo, JF. Bundy, DAP. Bianco, AE. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect-ELISA. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993a; 87: 173-176.

Conway, DJ. Bailey, JW. Lindo, JF. Robinson, RD. Bundy, DAP. Bianco, AE. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. J Infect Dis 1993b 168: 784-787.

Costa-Cruz, JM. Bullamach, CB. Goncalves-Pires, MRF. Campos, DMB. Vieira, MA.. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. Rev Inst Med Trop São Paulo 1997; 39: 313-317.

Cross, JH. Public health importance of *Angiostrongylus cantonensis* and its relatives. Parasitol Today. 1987; 3: 367-369.

Cummings, RD. Nyame, AK.. Glycobiology of schistosomiasis. FASEB J. 1996; 10: 838-848.

De Paula, FM. Castro, E. Gonçalves-Pires, MRF. Marçal, MG. Campos, DMB. Costa-Cruz, JM. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2000; 42: 51-55.

Despommier, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 265-272.

Dekumyoy, P. et al. Angiostrongyliasis: analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. 31 Suppl 2000; 1: 48-53.

Dreyer, G. Fernandes-Silva, E. Alves, S. Rocha, A. Albuquerque, R. Addiss, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2569-2571.

Eamsobhana, P. Mak, JW. Yong, HS. Identification of *Parastrongylus cantonensis* specific antigens for use in immunodiagnosis. Int Med Res J, 1997; 1: 1-5.

Eamsobhana, P. Tungtrongchitr, A. Wanachiwanawin, D. Yong, HS. Mak, JW. Characterization of a 31-kDa specific antigen from *Parastrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). International Medical Research Journal. 1998; 2(1): 9-12.

Eamsobhana, P. The rat lungworm *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis*: parasitology, immunology, eosinophilic meningitis, epidemiology and laboratory diagnosis. Bangkok, Wankaew (IQ) Book Center Co Ltd. 45 2006

Eamsobhana, P. Yong, HS. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). Int J of Inf Dis. 2009; 13: 425-431.

Fan, CK. Lin, YH. Du, WY. Su, KE.. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. Vet. Parasitol. 2003; 113: 145-155.

Geiger, SM. Alexander, NDE. Fujiwara, RT. Brooker, S. Cundill, B. Diemert, DJ. Correa-Oliveira, R. Bethony, JM. *Necator americanus* and Helminth Co-infections Further Down-Modulation of Hookworm-Specific Type 1 Immune Responses. Plos Neglected Tropical Disease. 2011; 5(9): 1280.



Gam, AA. Neva, FA. Krotoski, WA. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of Strongyloidiasis with larval antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37(1): 157-161.

Glickman, LT.. The epidemiology of human toxocariasis. In: Lewis, J.W., Maizels, R.M. (Eds), *Toxocara and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives.* Intitute of Biology, London, England. 1993; 3-10.

Graeff-Teixeira, C. Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.1986; 137

Graeff-Teixeira, C. Angiostrongyliasis. An underdiagnosed Disease. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, 1987.

Graeff-Teixeira, C. Camillo-Coura, L. & Lenzi, HL.. Angiostrongilíase abdominal – Nova Parasitose no Sul do Brasil. *Rev. AMRIGS.* 1991; 35: 91-98.

Graeff-Teixeira, C. Agostini, AA. Camillo-Coura, L. & Ferreira da Cruz, F. Seroepidemiology of abdominal angiostrongiliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop. Med. Int. Health.* 1997; 3: 254-260.

Graeff-Teixeira, C. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 101: 743-744.

Grove, DI. Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol* 1996; 38: 251-309.

Hartl, FU. Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002; 295(5561): 1852-8.

Hunninghake, GM. Soto-Quiros, ME. Avila, L. Ly, NP. Liang, C. Sylvia, JS. Klanderman, BJ. Silverman, EK. Celedón, JC. Sensitization to *Ascaris lumbricoides* and severity of childhood asthma in Costa Rica. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 654-661.

Ishii, AL. Effects of temperature on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *Parasit. Res.*1984; 70: 375-379.

Jaroonvesama, N. Differential diagnosis of eosinophilic meningitis. *Parasitol Today.* 1988; 4: 262-6.

Kanamura, HY. Hancock, K. Rodrigues, V. Damian, RT. Schistosoma mansoni heat shock protein 70 elicits an early humoral immune response in S. mansoni infected baboons. 2002; 97(5): 711-716.

Kirsch, S. Dekumyoy, P. Loscher, T. Haberl, RL. A case of eosinophilic meningitis. Germany *J Neurol.* 2008; 255(7): 1102-3

Khoo, KH. Dell, A. Glycoconjugates from parasitic helminthes: Structure diversity and immunobiological implications. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491:185-205.

Levi, MH. Raucher, BG. Teicher, E. Sheehan, DJ. & McKittrick, JC. *Hymenolepis diminuta*: one of three pathogens isolated from a child. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 1987; 7: 255-259.

Lescano, SA. Nakhle, MC. Ribeiro, MC. Chieffi, PP. IgG antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012; 54(3): 145-152

Lima ARMC, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. Aicata Disease. 2009; 67: 1093-1096

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

Lindo, JF. Waugh, C. Hall, J. Myrie-Cunningham, C. Ashley, D. Eberhard, ML. Sullivan, JJ. et al. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an Outbreak of Human Eosinophilic Meningitis, Jamaica. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8(3); 324-326.

Liu, LX. Weller, PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. Infect Dis Clin North Am. 1993; 7: 655-682.

Lo, CT. Ayele, Y. & Birrie, H. Helminth and snail survey in Harerge region of Ethiopia with special reference to schistosomiasis. Ethiopian Medical Journal. 1989; 27: 73-83.

Lobo-Sanahuja, F. Loria-Cortes, R. e Gonzalez, G. Angiostrongilosis abdominal. Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de literatura. Bol. Méd. Hosp. 1987; 44: 4-9.

Loria-Cortes, R. & Lobo-Sanahuja, JF. Clinical abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1980; 29: 538-544.

Lynch, NR. Hagel, IA. Palenque, ME. Di Prisco, MC. Escudero, JE. Corão, LA. Sandia, JÁ. Ferreira, LJ. Botto, C. Perez, M. Le Souef, PN. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. J Allergy Clin Immunol. 1998; 101: 217-221.

Machado, ER. Costa-Cruz, JM. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlandia city, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998; 93:161-164.

Maldonado AJ, Simões RO, Oliveira APM, Mott EM, Fernandez MA, Pereira ZM. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105: 938-941

Mas-Coma, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol. 2005; 79:207-216.

McKay, DM. The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. Parasitology. 2010; 137(3): 385-94

- McMillian, B. Kelly, A. & Walker, JC. Prevalence of *Hymenolepis diminuta* infection in man in the New Guinea Highlans. *Tropical and Geographical Medicine* 1971; 23: 390-392.
- Mentz, MB, Graeff-Teixeira, C. & Garrido, CT. Treatment with mebendazole is not associated with distal migration of adult *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2004; 46(2): 73-75.
- Mercado, R. & Arias, B. Infecciones por *Taenia* sp y otros cestodos intestinales en pacientes de consultorios y hospitals publicos del sector norte de Santiago de Chile (1985-1995). *Boletin Chileno de Parasitologia.* 1995; 50: 80-83.
- Mesén-Ramirez, P. et al. *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Journal of Helminthology.* 2008; 82: 251–254.
- Mojon, M. Angiostrongylose humaine à *Angiostrongylus costaricensis*. *Bull.Acad. Matle. Méd.* 1994; 178: 645-633.
- Morassutti, AL. Pinto, PM. Dutra, BK. Oliveira, GT. Ferreira, HB. Graeff-Teixera, C. Detection of anti-oxidant enzymatic activities and purification of glutathione transferases from *Angiostrongylus cantonensis*. *Exp. Parasitol.* 2011; 127: 365-369.
- Morassutti, AL. Levert, K. Perelygin, A. Da Silva, AJ. Wilkins, P. Graeff-Teixeira, C. The 31-kDa Antigen of *Angiostrongylus cantonensis* Comprises Distinct Antigenic Glycoproteins. *Vector-Borne and Zoon Dis.* 2012; 12 (xx)
- Moreira, VL. Giese, EG. Melo, FT. Simões, RO. Thiengo, SC. Maldonado, A Jr. Santos, JN. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trop.* 2012; 125(1): 90-97
- Morera, P. & Cespedes, R. Angiostrongilosis Abdominal – una nueva parasitosis humana. *Acta Med. Cost.* 1971; 14: 159- 173.
- Morera, P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1973; 22: 613-621.
- Morera, P. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasit. Today.* 1985; 1: 173-175.
- Morimatsu, Y. Akao, N. Akiyoshi, H. Kawazu, T. Okabe, Y. Aizawa, H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75: 303-306.
- Mota, EM. & Lenzi, HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1995; 90: 707-709
- Naquira, C. Delgado, E. Tantalean, M. Naquira, F. & Elliot, A. Prevalencia de enteroparasitos em escolares de lós distritos de San Juan y Magdalena. *Revista do Peruvian de Medicina Tropical.* 1973; 2: 37-40.

Neuhauss E, Fitarelli M, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 49-52

Nkouawa, A. Sako, Y. Itoh, S. Kouojip-Mabou, A. Nganou, CN. Saijo, Y. Knapp, J. Yamasaki, H. Nakao, M. Nakaya, K. Moyou-Somo, R. Ito, A. Serological studies or neurological helminthic infections in rural áreas of southwest cameroon: toxocariasis, cysticercosis and paragonimiasis. Plos Negl. Trop. Dis. 2010; 4(7): 732

Nomura, S. Lin, H. First Clinical Case of *Hemostrongylus ratti*. J. Trop. Med. Hyg. 1945; 13: 589-590.

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

Oladiran, A. Belosevic, M. *Trypanossoma carrassi* hsp70 increases expression of inflammatory cytokines and chemokines in macrophages of the goldfish (*Carassius auratus* L.). Dev. Comp. Immunol. 2009; 33(10): 1128-1136.

Panpiglione, S. Visconti, S. & Pezzino, G. Human intestinal parasites in Subsaharan Africa. Sao Tome and Principe. Parasitologia 1987; 29: 15-25.

Pena, JPM. Andrade-Filho, JS. Assis, SC. *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. São Paulo. 1995; 37: 369- 374.

Petney, TN. Andrews, RH. Multiparasites communities in animals and humans frequency, structure and pathogenic significance. Int J Parasitol. 1998; 28: 377-393.

Pien, FD. & Pien, BC. *Angiostrongylus cantonensis* Eosinophilic Meningitis. International Journal of Infections Diseases. 1999; 3: 161-163.

Pinto, LA. Pitrez, PMC. Fontoura, GR. Machado, DC. Jones, MH. Graeff-Teixeira, C. & Stein, RT. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. Parasite Immunology. 2004; 26(3): 000-000.

Qvarnstrom Y, Silva ACA, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C. Improved Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Mollusks and Other Environmental Samples with a Specie-Specific Internal Transcribed Spacer 1-Based TaqMan Assay. Applied and Environmental Microbiology 2010; 76: 5287-5289

Reason, AJ. Ellis, LA. Appleton, JA. Wisnewski, N. Grieve, RB. Mc Neil, M. Wassom, DL. Morris, HR. Dell, A. Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N- glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spirallis*. Glycobiology. 1994; 4: 593-603.

Rey, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A. 1991; 955.

Rocha, A. Moscardini Sobrinho, J. & Salomão, EC. - Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. Rev. Soc. bras. Med. trop. 1991; 24: 265-268.

Santos, CP. Redescritção de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* isolado de um novo hospedeiro silvestre, *Proechimys* sp. na Venezuela (Metastrongyloidea: Angiostrongylidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1985; 80: 81-83

Sato, Y. Kobayashi, J. Shiroma, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 37: 25-41.

Shevchenko, A. Wilm, M. Vorm, O. Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry. 1996; 8 68: 850-858.

Sicherer, SH. Sampson, HA. Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. J. Allergy Clin. Immunol. 2007; 120(3): 491-503.

Silva, LP. et al. Western Blotting Using *Strongyloides ratti* Antigen for the Detection of IgG Antibodies as Confirmatory Test in Human Strongyloidiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003; 98(5): 687-691.

Silva, AC. Graeff-Teixeira, C. & Zaha, AA. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. Rev. Inst Med Trop. São Paulo. 2003; 45 (5): 295-297.

Simões RO, Monteiro FA, Sánchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2011; 17: 1331-1333.

Sinawat, S. et al. Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases. Eye. 2008; 22: 1446-1448.

Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. N Engl J Med. 2002; 346: 668-675

Smith, H. Holland, C. Taylor, M. Magnaval, JF. Schantz, P. Maizels, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol. 2009; 25: 182-188

Stephenson, LS. Latham, MC. Ottesen, EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. Parasitology. 2000; 121: S23-S38.

Strachan, DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989; 299, 1259-1260

Tantrawatpan, C. et al. Characterisation of *Fasciola gigantica* adult 27-Kda excretory-secretory antigen in human fascioliasis. Parasitol. Res. 91: 325-327

Teles HMS, Vaz JF, Fontes LR, Domingos MF. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. Ver Saúde Pública. 1997; 31: 310-312

Tena, D. Perez Simon, M. Gimeno, M. Perez Pomata, Mt. Illescas, S. Amondarain, I. Gonzalez, A. Domínguez, J. & Bisquert, J. Human infection with *Hymenolepis diminuta*: case report FROM Spain. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 2375-2376.

Ubelaker, JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. J Parasitol. 1986; 72(2): 237-44.

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

Vibanco-Pérez, N. Jiménez, L. Merchant, MT. Landa, A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. The journal of Parasitology. 1999; 85: 448-453.

Vitta, A. et al. Application of recombinant SMR-domain containing protein of *Angiostrongylus cantonensis* in immunoblot diagnosis of human angiostrongyliasis. Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. 2010; 41(4):785-99.

Wang, QP. et al. Human angiostrongyliasis. Guangzhou, China: Lancet Infect Dis 2008; 8: 621–30.

Yang, J. Kennedy, MT. Value of ELISA in the detection of visceral larva migrans (VLM). Can J Public Health. 1979; 70:58

Yoshiya, S. et al. Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1985; 79 : 51-55.

Yoshikawa, M. Nishiofuku, M. Moriya, K. Oujii, Y. Ishizaka, S. Kasahara, K. Mikasa, K. Hirai, T. Mizuno, Y. Ogawa, S. Nakamura, T. Maruyama, H. Akao, N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. Parasitol. Int. 2008; 57: 525-529.

Ziliotto, JA. Kunzle, JE. Fernandes, LAR. Prates-Campos, JC. Brito-Costa, R. Angiostrongilíase: apresentação de provável caso. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1975; 17:312-318.

## APÊNDICE 1

### **First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, southern Brazil.**

Bianca B. Cognato; Alessandra L. Morassutti; Ana Cristina Aramburu da Silva; Carlos Graeff-Teixeira.

Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências e Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av Ipiranga 6690, 90690-900 Porto Alegre RS, Brazil. Phone: +55 51 3320.3500 extention: 4144 Fax: +55 51 3320.3568

*Angiostrongylus cantonensis* is a lungworm found in rats (mainly *Rattus norvegicus*) and the main etiological agent eosinophilic meningitis after accidental human infection. Parasitological diagnosis is difficult because larvae are seldom found in cerebrospinal fluid examinations, molecular methods are thus required. According to Wang et al (2008) (1) more than 2820 cases have been reported in approximately 30 countries most in Asia and the Pacific Islands. *A. cantonensis* infection has been increasingly detected in travelers returning from endemic areas (2) and it is now considered a growing food safety concern (3).

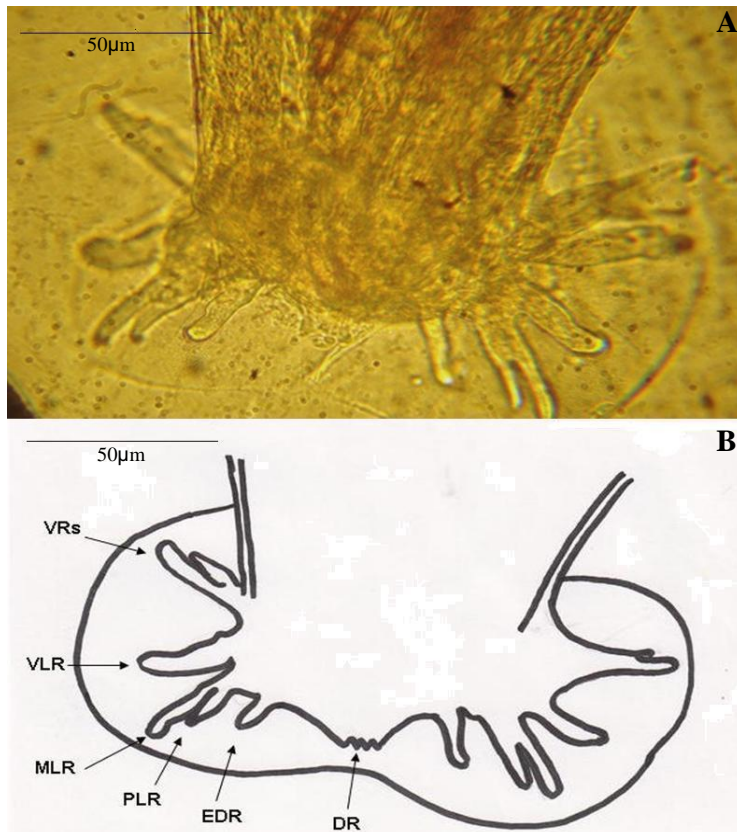
The laboratory isolation and identification of this parasite were reported for the first time in Brazil in the state of Espírito Santo after eosinophilic meningitis was diagnosed in two patients there (4), followed by the diagnosis in two patients in Pernambuco (5). *A. cantonensis* larvae, worm or DNA have been detected in hosts from several locations coastal Brazil, from Pará in the north to Santa Catarina in the south (6,7,8)

While trying to isolate larvae of *Strongyloides ratti* or *S. venezuelensis* in an investigation of cross-reacting antigens to *A. costaricensis* one rat (*R. norvegicus*) was

captured in Vila Fátima, Porto Alegre, Brazil (30° 2' 53.99" S 51° 9' 30.69" W). It was kept alive for the collection of larvae from feces. The animal died a few hours after capture and a necropsy was performed. The lungs showed several areas with white hard consolidated lesions that were removed and analyzed under a stereomicroscope. Eleven female and two male worms were found in the pulmonary arteries. They were clarified with creosoto and mounted on slides for examination under an optical microscope. The morphology of the male's copulatory bursa (figure 1) and the average lengths of the worms (females, 26.8 ± 2.41 cm; males, 20 ± 1,41 cm) were in accordance with data from the literature (9). Real time polymerase chain reaction demonstrated a similarity in cycle thresholds (CTs) between DNA sequences from the worms (CT=12) and those from Akita strain of *A. cantonensis* (CT=8).

*A. cantonensis* probably entered Brazil on cargo ships from endemic areas carrying infected rats or an intermediate host (10). Porto Alegre is a commercial port city on the Guaíba River where ships deliver many products such as fertilizers, soybeans and salt from many parts of the world including India, Egypt, China and other areas of Brazil. Other Brazilian locations where the presence of *A. cantonensis* has been reported are also in or adjacent to harbors indicating that dispersion of the nematode might be occurring through rats on ships. Vila Fátima is approximately 11 km from the Guaíba harbor, it is linked to the port by a stream, Arroio Dilúvio, that is also partially linked to the wastepipe effluent system, which provides a natural habitat and pathway for rats. Although raw mollusks are not typically consumed in Brazil, currently available data indicate that sanitary education and epidemiological surveillance must be urgently updated. The increasing global transit of persons and good is rapidly changing the distribution pattern of infections agents such as *A. cantonensis*.





Adult worms detected in the pulmonary arteries of a rat in Porto Alegre, southern Brazil. Ventral image (A) and drawing (B) of a male worm's copulatory bursa, indicating the bursal rays: ventral (VRs), ventrolateral (VLR), mediolateral (MLR), posterolateral (PLR), externolateral (EDR), and dorsal (DR).

## References

- (1) Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 621-630.
- (2) Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus Cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *N Engl J Med.* 2002; 346: 668-675
- (3) Qvarnstrom Y, Silva ACA, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C. Improved Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Mollusks and Other Environmental Samples with a Specie-Specific Internal Transcribed Spacer 1-Based TaqMan Assay. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76: 5287-5289
- (4) Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Walter S Lima. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102: 887-889
- (5) Lima ARMC, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Alicata Disease.* 2009; 67: 1093-1096
- (6) Teles HMS, Vaz JF, Fontes LR, Domingos MF. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Ver Saúde Pública.* 1997; 31: 310-312
- (7) Neuhauss E, Fitarelli M, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102: 49-52

(8) Simões RO, Monteiro FA, Sánchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17: 1331-1333

(9) Maldonado AJ, Simões RO, Oliveira APM, Mott EM, Fernandez MA, Pereira ZM. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 938-941

(10) Graeff-Teixeira C. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 101: 743-744.