

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**CURSO DE MEDICINA**

**Declaração de entrega do Trabalho de Conclusão de  
Curso**

Declaro que o trabalho intitulado DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI-STRONGYLOIDES UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE realizado pelo(s) aluno(s) Johnny Melo Ferreira da Silva e Thaís Oliveira da Silva está apto para entrega, apresentação e avaliação das bancas nomeadas.

Prof. Dr. Marcelo Andreetta Corral

---

Assinatura do Orientador do Trabalho

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**CURSO DE MEDICINA**

**Johnny Melo Ferreira da Silva**  
**Thaís Oliveira da Silva**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI-STRONGYLOIDES**  
**UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM PACIENTES**  
**COM ARTRITE REUMATOIDE**

**São Paulo**  
**2024**

**Johnny Melo Ferreira da Silva**

**Thaís Oliveira da Silva**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI-STRONGYLOIDES  
UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM PACIENTES  
COM ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Medicina da  
Universidade Santo Amaro – UNISA,  
como requisito parcial para obtenção  
do título Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andreetta  
Corral

**São Paulo**

**2024**

S58d

Silva, Johnny Melo Ferreira da.

Detecção de anticorpos IgG anti-Strongyloides utilizando antígeno heterólogo em pacientes com artrite reumatoide / Johnny Melo Ferreira da Silva, Thaís Oliveira da Silva. – São Paulo, 2024.

24 p. : il., color.

Orientador: Marcelo Andreetta Corral.

TCC Graduação. (Curso Superior em Medicina) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Sorologia. 2. Strongyloides. 3. Artrite reumatoide. I. Silva, Thaís Oliveira da. II. Corral, Marcelo Andreetta, orient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

CDD 616.96

**Johnny Melo Ferreira da Silva**

**Thaís Oliveira da Silva**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI-STRONGYLOIDES  
UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM PACIENTES  
COM ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andreetta Corral

São Paulo, 22 de Novembro de 2024

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Marcelo Andreetta Corral

Orientador

Profa. Dra. Renata Tonhosolo

Avaliadora

Prof. Dr. Jorge Figueiredo Senise

Avaliador

**Conceito Final**

---

Johnny Melo Ferreira da Silva, Thaís Oliveira da Silva, Samuel Nascimento dos Santos, Jonas Moraes Filho, Marina Tiemi Shio, Luiz Henrique da Silva Nali, Ronaldo Cesar Borges Gryscek, Fabiana Martins de Paula, Marcelo Andreetta Corral. *Detecção de anticorpos IgG anti-Strongyloides utilizando antígeno heterólogo em pacientes com artrite reumatoide*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade Santo Amaro, 2024.

**INTRODUÇÃO:** *Strongyloides stercoralis* é o nematódeo intestinal causador da estrogiloidíase, geralmente assintomática em hospedeiros imunocompetentes. No entanto, pacientes imunossuprimidos, especialmente aqueles em corticoterapia, podem evoluir para síndrome de hiperinfecção ou doença disseminada. O *S. stercoralis* tem distribuição mundial, afetando até 600 milhões de pessoas e apresenta penetração cutânea, além de possuir um ciclo de vida complexo. Pacientes em terapia com corticosteroides para artrite reumatoide estão em risco de complicações da estrogiloidíase. O diagnóstico é desafiador devido à eliminação intermitente de parasitas nas fezes, exigindo, assim, o uso de técnicas sorológicas como o teste ELISA IgG com antígenos larvais que é altamente sensível e específico. O objetivo deste estudo foi conduzir o imunodiagnóstico da estrogiloidíase por meio da utilização de antígenos heterólogos no soro de pacientes previamente diagnosticados com artrite reumatoide. **METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo retrospectivo utilizando amostras de soro previamente coletadas. Foi realizado um inquérito sorológico em 30 pacientes com diagnóstico prévio de artrite reumatoide. Os antígenos para a sorologia de estrogiloidíase foram obtidos a partir de larvas de *Strongyloides venezuelensis*. O ELISA foi conduzido para determinar a presença de anticorpos e os valores de absorbância foram analisados estatisticamente. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O ponto de corte do ELISA para o antígeno STL (solúvel) foi 0,256 e do MTL (membrana) foi 0,31. Diante deste cenário de validação prévia a partir de estudos de determinação da acurácia chegou-se a 36,7% (11 pacientes) de positividade utilizando o antígeno STL e 26,7% (8 pacientes) no MTL. **CONCLUSÃO:** Este estudo reforça a necessidade de realização de testes sorológicos em pacientes que serão encaminhados para corticoterapia.

**Palavras-chave:** Strongyloides. Artrite reumatoide. Sorologia.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Strongyloides stercoralis* is the intestinal nematode responsible for strongyloidiasis, which is typically asymptomatic in immunocompetent hosts. However, immunosuppressed patients, particularly those undergoing corticosteroid therapy, may progress to hyperinfection syndrome or disseminated disease. *S. stercoralis* has a global distribution, affecting up to 600 million people, and is characterized by its ability to penetrate the skin and its complex life cycle. Patients receiving corticosteroid therapy for rheumatoid arthritis are at risk for complications associated with strongyloidiasis. Diagnosis is challenging due to the intermittent shedding of parasites in the feces, necessitating the use of serological techniques such as the ELISA IgG test with larval antigens, which is highly sensitive and specific. The aim of this study was to conduct the immunodiagnosis of strongyloidiasis using heterologous antigens in the serum of patients with a prior diagnosis of rheumatoid arthritis. **METHODOLOGY:** This is a retrospective study using previously collected serum samples. A serological survey was conducted in 30 patients with a previous diagnosis of rheumatoid arthritis. The antigens for the serology of strongyloidiasis were obtained from larvae of *Strongyloides venezuelensis*. The ELISA was performed to determine the presence of antibodies and the absorbance values were statistically analyzed. **RESULTS AND DISCUSSION:** The cutoff point for the ELISA using the STL (soluble) antigen was 0.256 and for the MTL (membrane) antigen it was 0.31. Based on this preliminary validation from accuracy determination studies, a positivity rate of 36.7% (11 patients) was achieved using the STL antigen and 26.7% (8 patients) with the MTL antigen. **CONCLUSION:** This study underscores the necessity of conducting serological tests in patients who will be referred for corticosteroid therapy.

**Keywords:** Strongyloides. Rheumatoid arthritis. Serology.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2. METODOLOGIA</b>	14
2.1 Desenho do estudo	14
2.2 Amostragem	14
2.3 Critérios de inclusão	14
2.4 Sorologia para estrogiloidíase	14
2.4.1 Obtenção dos antígenos brutos	14
2.4.2 Caracterização dos antígenos	15
2.4.3 ELISA	15
2.4.4 Análise de dados	16
2.5 Normas de Biossegurança	16
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	16
3.1 Análise do perfil eletroforético dos antígenos	16
3.2 Caracterização da população de estudo	17
3.3 Detecção de anticorpos anti- <i>Strongyloides</i>	18
3.4 Análise dos pacientes positivos no antígeno STL	19
3.5 Análise dos pacientes positivos no antígeno MTL	20
<b>4. CONCLUSÃO</b>	22
<b>REFERÊNCIAS</b>	23

# DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI-STRONGYLOIDES UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

## DETECTION OF IGG ANTIBODIES AGAINST STRONGYLOIDES USING HETEROLOGOUS ANTIGEN IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

DA SILVA, Johnny Melo Ferreira<sup>1</sup>

DA SILVA, Thaís Oliveira<sup>2</sup>

CORRAL, Marcelo Andreetta Corral<sup>3</sup>

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Strongyloides stercoralis* é o nematódeo intestinal causador da estrogiloidíase, geralmente assintomática em hospedeiros imunocompetentes. No entanto, pacientes imunossuprimidos, especialmente aqueles em corticoterapia, podem evoluir para síndrome de hiperinfecção ou doença disseminada. O *S. stercoralis* tem distribuição mundial, afetando até 600 milhões de pessoas, e apresenta penetração cutânea, além de possuir um ciclo de vida complexo. Pacientes em terapia com corticosteroides para artrite reumatoide estão em risco de complicações da estrogiloidíase. O diagnóstico é desafiador devido à eliminação intermitente de parasitas nas fezes, exigindo, assim, o uso de técnicas sorológicas como o teste ELISA IgG com antígenos larvais que é altamente sensível e específico. O objetivo deste estudo foi conduzir o imunodiagnóstico da estrogiloidíase por meio da utilização de antígenos heterólogos no soro de pacientes previamente diagnosticados com artrite reumatoide. **METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo retrospectivo utilizando amostras de soro previamente coletadas. Foi realizado um inquérito sorológico em 30 pacientes com diagnóstico prévio de artrite reumatoide. Os antígenos para a sorologia de estrogiloidíase foram obtidos a partir de larvas de *Strongyloides venezuelensis*. O ELISA foi conduzido para determinar a presença de anticorpos e os valores de absorbância foram analisados estatisticamente. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O ponto de corte do ELISA para o antígeno STL (solúvel) foi 0,256 e do MTL (membrana) foi 0,31. Diante deste cenário de validação prévia a partir de estudos de determinação da acurácia chegou-se a 36,7% (11 pacientes) de positividade utilizando o antígeno STL e 26,7% (8 pacientes) no MTL. **CONCLUSÃO:** Este estudo reforça a necessidade de realização de testes sorológicos em pacientes que serão encaminhados para corticoterapia.

**Palavras-chave:** Strongyloides. Artrite reumatoide. Sorologia.

---

<sup>1</sup> Graduando em Medicina da Universidade Santo Amaro. tjohnny@estudante.unisa.br

<sup>2</sup> Graduando em Medicina da Universidade Santo Amaro. g-thais@estudante.unisa.br

<sup>3</sup> Professor Orientador. Doutor, Universidade Santo Amaro - SP – mcorral@prof.unisa.br

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Strongyloides stercoralis* is the intestinal nematode responsible for strongyloidiasis, which is typically asymptomatic in immunocompetent hosts. However, immunosuppressed patients, particularly those undergoing corticosteroid therapy, may progress to hyperinfection syndrome or disseminated disease. *S. stercoralis* has a global distribution, affecting up to 600 million people, and is characterized by its ability to penetrate the skin and its complex life cycle. Patients receiving corticosteroid therapy for rheumatoid arthritis are at risk for complications associated with strongyloidiasis. Diagnosis is challenging due to the intermittent shedding of parasites in the feces, necessitating the use of serological techniques such as the ELISA IgG test with larval antigens, which is highly sensitive and specific. The aim of this study was to conduct the immunodiagnosis of strongyloidiasis using heterologous antigens in the serum of patients with a prior diagnosis of rheumatoid arthritis. **METHODOLOGY:** This is a retrospective study using previously collected serum samples. A serological survey was conducted in 30 patients with a previous diagnosis of rheumatoid arthritis. The antigens for the serology of strongyloidiasis were obtained from larvae of *Strongyloides venezuelensis*. The ELISA was performed to determine the presence of antibodies and the absorbance values were statistically analyzed. **RESULTS AND DISCUSSION:** The cutoff point for the ELISA using the STL (soluble) antigen was 0.256 and for the MTL (membrane) antigen it was 0.31. Based on this preliminary validation from accuracy determination studies, a positivity rate of 36.7% (11 patients) was achieved using the STL antigen and 26.7% (8 patients) with the MTL antigen. **CONCLUSION:** This study underscores the necessity of conducting serological tests in patients who will be referred for corticosteroid therapy.

**Keywords:** Strongyloides. Rheumatoid arthritis. Serology.

## 1 INTRODUÇÃO

*Strongyloides stercoralis* é o nematódeo intestinal causador da estrogiloidíase, helmintíase responsável por infecções crônicas, geralmente assintomáticas, do trato gastrointestinal em hospedeiros humanos imunocompetentes. Em pacientes imunocomprometidos por terapia imunossupressora (particularmente corticosteroides) esta infecção pode evoluir para uma síndrome de hiperinfecção ou doença disseminada.<sup>1-2</sup> O *S. stercoralis* apresenta distribuição mundial afetando até 600 milhões de pessoas, sendo prevalente sobretudo em regiões tropicais e subtropicais.<sup>2-3</sup>

Este parasita infecta o homem através da penetração cutânea e tem um ciclo de vida complexo que envolve 2 estágios de desenvolvimento: uma fase de vida livre, que ocorre no meio ambiente, e uma etapa como parasita, dentro do hospedeiro. A fêmea partenogenética de *S. stercoralis* põe poucos ovos que se depositam no epitélio intestinal e, conseqüentemente, as larvas rabditoides são excretadas nas fezes dos pacientes. Por um processo de auto infecção pode haver um rápido aumento no número de larvas infectantes. O fato de que as formas de vida livre do parasita no solo dependem de condições ambientais favoráveis, como umidade e alta temperatura, torna as condições em muitas regiões do Brasil ideais para o seu desenvolvimento e manutenção.<sup>1</sup>

Dentre os grupos de pacientes em corticoterapia estão os que tratam artrite reumatoide (AR), doença sistêmica inflamatória e autoimune, caracterizada por comprometimento da membrana sinovial preferencialmente em articulações periféricas.<sup>4</sup> Com prevalência variando de 0,4% a 1,3% da população, 3:1 para o sexo feminino, idade (pico de incidência na sexta década de vida) e estudo coletivo de pacientes (a frequência aumenta de sul para norte e é maior nas áreas urbanas do que nas rurais), a AR é uma das doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes.<sup>5-6</sup>

Clinicamente, os sintomas diferem significativamente entre o estágio inicial e os estágios posteriores da doença insuficientemente tratados. A AR em estágio inicial é caracterizada por sintomas como fadiga, sensação semelhante à gripe, articulações inchadas e sensíveis e rigidez matinal. Em contraste, a AR insuficientemente tratada apresenta um quadro clínico complexo com a ocorrência de manifestações sistêmicas graves com comprometimento pulmonar, hematológico e vascular, desalinhamento articular, perda da

amplitude de movimento, erosão óssea, destruição da cartilagem e nódulos reumáticos.<sup>5</sup>

Na AR, a destruição tecidual autoimune se manifesta como sinovite, uma inflamação da cápsula articular constituída pela membrana sinovial, líquido sinovial e os respectivos ossos. Essa inflamação articular é iniciada e mantida pela interação complexa entre células dendríticas, linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e osteoclastos. A presença de agregados de imunoglobulina G (IgG) ou complexos de IgG-FR (fator reumatoide) ativa o sistema complemento e desencadeia processos inflamatórios. Além disso, a interação desses complexos imunes com os fagócitos leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), agravando ainda mais esse processo. Uma vez que os auto antígenos específicos da AR não podem ser completamente eliminados pelo sistema imunológico, essa ativação celular contínua resulta em um estado inflamatório crônico da articulação e edema da membrana sinovial que é reconhecido pelos pacientes acometidos como dor e inchaço articular.<sup>5,7</sup>

A abordagem terapêutica da AR tem como objetivo alcançar a remissão da doença e reduzir os efeitos colaterais. Os agentes farmacológicos utilizados para preservar a função articular são as drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs). Além disso, o controle dos sintomas envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e glicocorticoides (GCs) como terapia adjuvante para reduzir a inflamação.<sup>6,8</sup> O uso de GCs (prednisona e prednisolona) em pacientes com AR em fase inicial associados a DMARDs (metotrexato) por 12 a 24 meses traz benefício clínico e radiológico.<sup>4</sup>

Os glicocorticoides apresentam efeito inibitório na resposta imune mediada por linfócitos T e B, assim como potente imunossupressão da função efetora dos monócitos e neutrófilos. Alterações das respostas imunes mediadas por células do tipo Th2 podem levar a quadros de hiperinfecção e disseminação da estrogiloidíase e a Síndrome de Hiperinfecção por *Strongyloides* (SHS) tem sido descrita em pacientes que fazem uso contínuo de glicocorticoide, independentemente da dose. Além do mecanismo anteriormente descrito, há também a elevação da concentração de derivados de glicocorticoides que por sua similaridade com a ecdisona (hormônio que regula a fecundidade das fêmeas partenogênicas e a transformação das

larvas rabditoides em filarioides infectantes) levam a quadros de SHS.<sup>9</sup>

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase rotineiramente é feito mediante a detecção de larvas nas fezes. Entretanto, devido a baixa quantidade de parasitos e a sua eliminação irregular nesse material o processo torna-se difícil. Com isso, as técnicas sorológicas, imunoenzimáticas principalmente, podem ser uma alternativa interessante para o diagnóstico da estrogiloidíase e possuem grande utilidade tanto em situações epidemiológicas quanto clínicas.<sup>10-11</sup> Entre as diversas técnicas utilizadas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, o teste ELISA tem se mostrado superior em relação à praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes, além de alta sensibilidade e especificidade. O IgG-ELISA usando antígenos de larvas filariformes de *Strongyloides venezuelensis* demonstrou 90-100% de sensibilidade e 92,4-98,4% de especificidade.<sup>12-13</sup>

O *Strongyloides stercoralis* é um parasita que possui forma de vida livre e depende de condições favoráveis de solo, umidade e temperatura para o seu desenvolvimento. Com isso, países de climas tropicais como o Brasil apresentam prevalência de infecções. Apesar de a maioria dos infectados serem assintomáticos, no caso dos pacientes em terapia imunossupressora pode haver uma evolução para síndrome de hiperinfecção ou doença disseminada. Portanto, a triagem (coprológica e/ou sorológica) adequada de indivíduos potencialmente infectados antes do início do tratamento é essencial. Costumeiramente o diagnóstico da estrogiloidíase é realizado por meio da detecção de larvas nas fezes, porém há baixa quantidade de parasitas e eliminação irregular nesse material, o que torna o processo dificultoso. As técnicas sorológicas, imunoenzimáticas principalmente, têm se destacado como uma alternativa interessante e possuem grande utilidade na análise de materiais coletados previamente.

Os pacientes em uso de fármacos imunossupressores para o tratamento da artrite reumatoide têm sido descritos como um dos grupos de interesse para estudo da evolução de estrogiloidíase crônica para quadros graves. A utilização de antígenos heterólogos pode aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste permitindo uma identificação mais precisa para o manejo clínico. O diagnóstico precoce da infecção por *S. stercoralis* nesses pacientes é essencial para um tratamento efetivo e esse estudo propõe a

aplicação de métodos sorológicos com essa finalidade. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar o imunodiagnóstico da estrogiloidíase através da utilização de antígenos heterólogos no soro de pacientes previamente diagnosticados com artrite reumatoide.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo a partir de amostras de soro previamente coletadas, gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Nali da Universidade Santo Amaro. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro (Parecer 6.523.777).

### **2.2 Amostragem**

Foram realizadas as sorologias para 30 pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide.

### **2.3 Critérios de inclusão**

Para o grupo de pacientes de estudo foram incluídas amostras de pacientes com diagnóstico clínico de artrite reumatoide de 18 a 80 anos.

### **2.4 Sorologia para estrogiloidíase**

#### **2.4.1 Obtenção dos antígenos brutos**

Foram utilizados antígenos heterólogos solúvel e de membrana de *Strongyloides venezuelensis*, gentilmente cedidos pela Dra. Fabiana Martins de Paula, pesquisadora científica VI do Laboratório de Investigação Médica (LIM-06) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esses antígenos foram produzidos a partir de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* que foram ressuspensas em tampão de homogeneização 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, suplementado com coquetel de inibidores de protease. Em seguida a solução de larvas passaram por sonicação e posterior centrifugação a 12400g/4°C por 30 minutos. O sobrenadante deu origem ao antígeno solúvel (STL). O pellet produzido foi ressuspenso em tampão de reidratação (Ureia 7M, Tiourea 2M e CHAPS 2%),

homogeneizado por 30 min/4°C e centrifugado a 12400g/4°C por 30 minutos. O sobrenadante deu origem a fração de membrana (MTL).

#### **2.4.2 Caracterização dos antígenos**

Uma alíquota da fração antigênica foi destinada a avaliação da concentração proteica pela técnica desenvolvida por Lowry et al. <sup>14</sup> (1951). Paralelamente, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para avaliação do padrão de migração eletroforética das bandas proteicas.

Para determinar o perfil de bandas, aproximadamente 20mg/mL por cm de gel das frações antigênicas foram submetidos a eletroforese, de acordo com Laemmli <sup>15</sup> (1970). O gel de poliacrilamida de 12% foi preparado em suporte vertical para mini-gel. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (125mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, Glicerol 20%, 50mM DTT, Azul de Bromofenol 0,01%) e aquecidas a 100°C em banho-maria por cinco minutos. Após a adição do tampão de corrida (25mM Tris, 192mM Glicina, 3,5mM SDS) foi realizada a eletroforese a 20mA/gel por aproximadamente duas horas. Foi utilizado padrão de massa molecular (10 a 260kDa - BioRad) para determinação das bandas proteicas relativas.

#### **2.4.3 ELISA**

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com Corral et al. <sup>11</sup> (2015), sendo que as placas de poliestireno foram sensibilizadas por um período de 16 horas com 10mg/ml das diferentes frações antigênicas, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 a 4°C. Após lavagem com PBS-T (tampão fosfato acrescido de Tween 20), foram adicionados os soros padrões negativos e positivos, bem como soros-testes diluídos em PBS-TM (PBS-T acrescido de leite em pó). Após 45 minutos a 37°C, nova lavagem com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano fração Fc marcado com peroxidase em PBS-TM. Após 45 minutos a 37°C, foi adicionado 100µL de reagente cromogênico TMB (3,3', 5,5;-tetrametilbenzidino – Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) na ausência da luz por 6 minutos. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Os valores de absorbância foram determinados em um leitor de ELISA no comprimento de onda de 450nm.

#### **2.4.4 Análise de dados**

Os resultados dos pacientes foram expressos pelo índice ELISA, que consiste na divisão dos valores de densidade óptica obtidos após a leitura pelo cut off da reação. São considerados positivos os pacientes que apresentaram índice ELISA superior a 1 ( $IE > 1,0$ ).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando programa GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad Software Inc. San Diego, USA) e o intervalo de confiança foi  $p < 0,05$  a partir do teste t de *student* pareado.

#### **2.5 Normas de Biossegurança**

Os procedimentos laboratoriais estiveram em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. <sup>16</sup> (2005) e pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial <sup>17</sup> (2013).

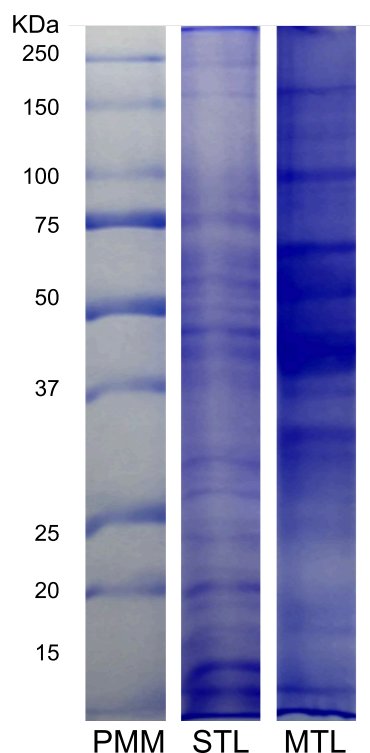
### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análise do perfil eletroforético dos antígenos**

Após a obtenção das frações antigênicas as concentrações proteicas foram 1,0mg/mL e 2,0mg/mL para as frações STL e MTL respectivamente. A análise por SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes foi realizada para observar o perfil das proteínas para cada fração antigênica. Observou-se diversas bandas proteicas com massas moleculares variando de 180-12kDa (Figura 1).

A análise do perfil eletroforético das frações antigênicas revelou bandas de massa molecular semelhantes, variando de 180 a 12kDa. Entretanto, há diferença no perfil eletroforético entre a antígeno STL e o MTL. O antígeno STL apresenta maior definição de bandas, destacando-se a de 75Kda, 42Kda e 30Kda. No antígeno de membrana é possível observar maior intensidade de marcação do gel sobretudo nas proteínas de 35, 47, 67, 100 e 150KDa. Gonçalves et al. <sup>18</sup> (2012) determinaram bandas com valores inferiores variando de 90 a 15kDa com o antígeno solúvel alcalino. Já Feliciano et al. <sup>19</sup> (2010) detectaram bandas de 131 a 35kDa com o antígeno solúvel salino e de 95 a 55kDa com o antígeno solúvel alcalino. Poucos são os estudos que exploram os antígenos de membrana na literatura nacional e internacional.

**Figura 1 - SDS-PAGE 1D 12% corado por Coomassie Blue indicando perfil proteico das frações solúvel (STL) e de membrana (MTL) de larvas filarioides de *S. venezuelensis***



Fonte: Os autores

### **3.2 Caracterização da população de estudo**

Foram selecionadas amostras de soro de 30 pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide proveniente de estudos prévios realizados pelo pesquisador Luiz Nali que gentilmente as cedeu para realização deste estudo. Trata-se de uma coorte de 27 (90%) indivíduos do gênero feminino e 3 (10%) do masculino com média de idade de 61,6 anos de idade. Os dados encontrados neste estudo corroboram com os encontrados na literatura, uma vez que a maior parte dos casos de artrite reumatoide acomete mulheres com mais de 50 anos.<sup>5-6</sup>

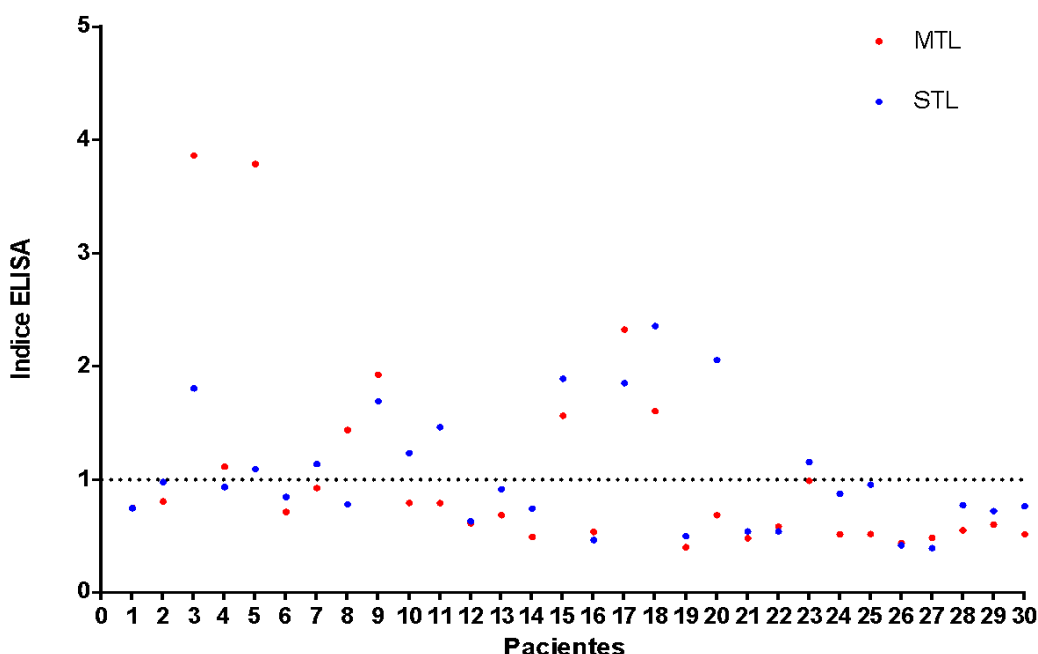
Observou-se que 15 (50%) pacientes fazem uso de medicamentos corticoides como a prednisona. Este fato está relacionado ao caráter inflamatório causado pela doença em que o principal tratamento é a indicação de uso de antiinflamatórios. Paralelamente ao uso de corticoides relacionado com a doença de base, também observou-se que alguns dos pacientes

apresentavam doenças associadas como a hipertensão arterial sistêmica (33,3%), diabetes (6,7%) e enfisema, doença de Chagas, depressão e hipotireoidismo (3,3% cada uma).

### 3.3 Detecção de anticorpos anti-*Strongyloides*

O ponto de corte do ELISA para o antígeno STL foi 0,256 e do MTL foi 0,31. Diante deste cenário de validação prévia a partir de estudos de determinação da acurácia <sup>11</sup> chegou-se a 36,7% (11 pacientes) de positividade utilizando o antígeno STL e 26,7% (8 pacientes) no MTL (Figura 2).

**Figura 2 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com artrite reumatoide na sorologia para detecção de anticorpos anti-*Strongyloides* (pacientes positivos estão apresentados acima da linha pontilhada) utilizando antígeno STL (representado pelas bolas azuis) e MTL (representado pelas bolas vermelhas)**



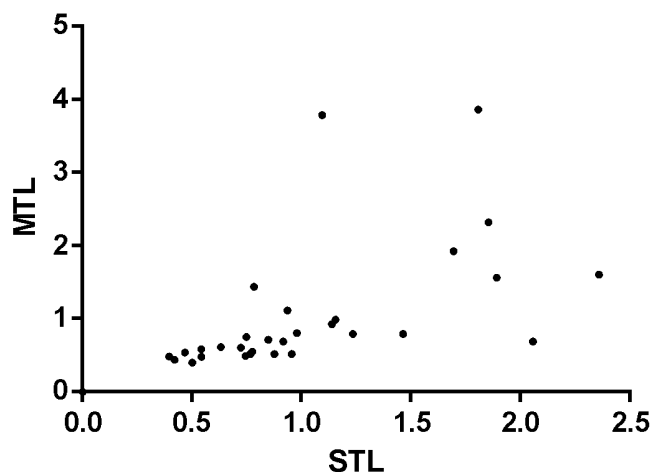
Fonte: Os autores

Houve correlação (Figura 3) estatisticamente significativa entre a utilização dos antígenos STL e MTL ( $p=0,0003$ ;  $r=0,5968$ ;  $R^2=0,3561$ ).

Há uma diferença entre o índice de positividade apresentado no ELISA realizado com cada um dos antígenos. Este fato pode estar associado às diferenças de proteínas expressas a partir dos tampões de extração de proteínas utilizados e vem sendo amplamente discutido na literatura atualmente

a partir dos debates envolvendo questões imunoproteômicas <sup>3,20-21</sup>

**Figura 3 - Correlação (de Pearson) entre os valores de Índice ELISA dos antígenos STL e MTL**



Fonte: Os autores

A porcentagem de positividade corrobora aos dados presentes na literatura no que tange a população imunodeprimida ou portadores de doenças crônicas.

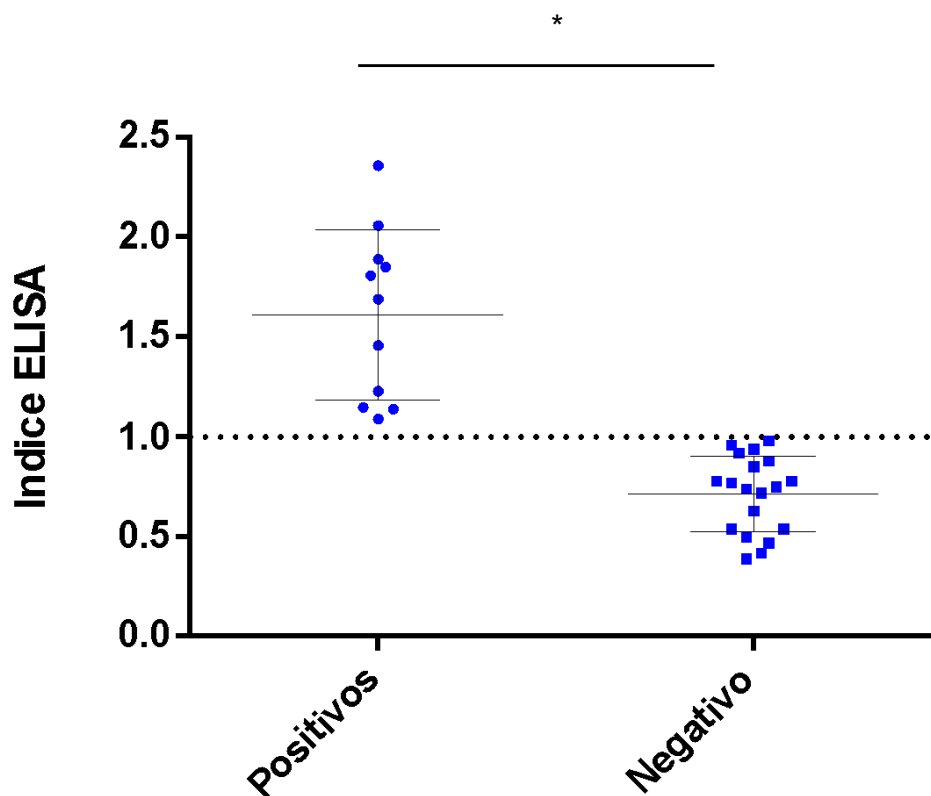
### 3.4 Análise dos pacientes positivos no antígeno STL

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o IE dos pacientes classificados como positivos e negativos (Figura 4).

Dentre os pacientes positivos no ELISA no antígeno STL observou-se que a média de idade foi de 66,8 anos, 9 (81,8%) eram do gênero feminino e 2 (19,2%) do masculino. Somente 4 (36,6%) faziam uso de medicamento corticoide e 72,7% (8 pacientes) possuíam comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (4 pacientes), diabetes (1 paciente), doença de Chagas (1 paciente), hipotireoidismo (1 paciente) e depressão (1 paciente).

Os pacientes com sorologia negativa para *Strongyloides* possuíam média de idade de 58,5 anos, 18 (94,7%) eram do gênero feminino e 1 (5,3%) do masculino. Onze (57,9%) faziam uso de medicamento corticoide e 72,7% (8 pacientes) possuíam comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (6 pacientes), diabetes (1 paciente) e enfisema (1 paciente).

**Figura 4 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com artrite reumatoide na sorologia para detecção de anticorpos anti-*Strongyloides* utilizando antígeno STL (pacientes positivos estão apresentados acima da linha pontilhada)**



Fonte: Os autores

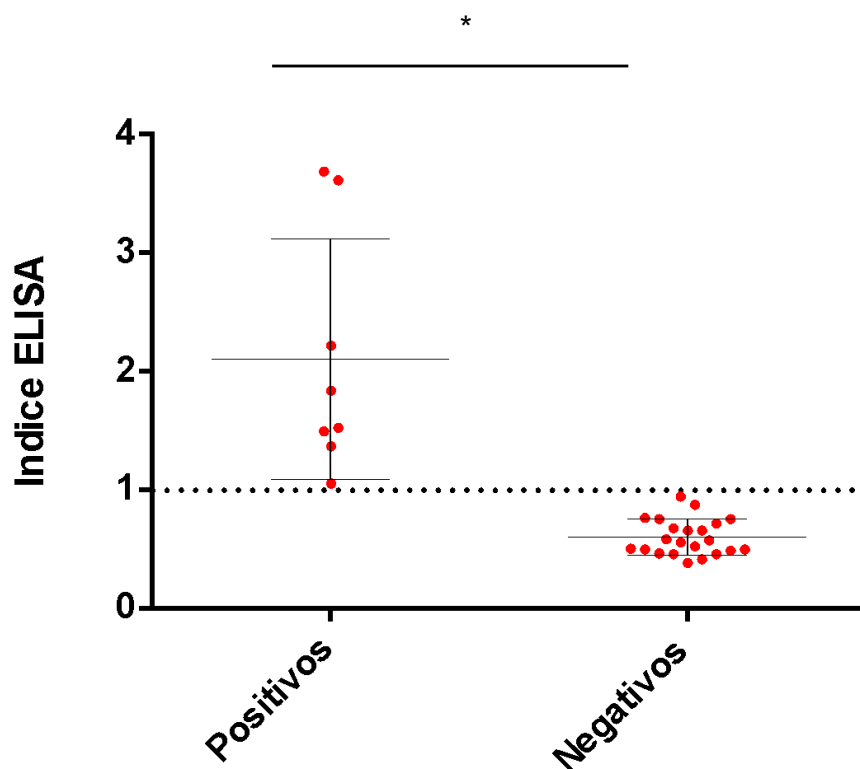
### 3.5 Análise dos pacientes positivos no antígeno MTL

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o IE dos pacientes classificados como positivos e negativos (Figura 5).

Dentre os pacientes positivos no ELISA no antígeno MTL observou-se que a média de idade foi de 67,1 anos, 7 (87,5%) eram do gênero feminino e 1 (12,5%) do masculino. Somente 2 (25%) faziam uso de medicamento corticoide e 50% (4 pacientes) possuíam comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (1 paciente), doença de Chagas (1 paciente), hipotireoidismo (1 paciente) e enfisema (1 paciente).

Os pacientes com sorologia negativa para *Strongyloides* possuíam média de idade de 58,5 anos, 20 (90,1%) eram do gênero feminino e 2 (9,9%) do masculino. Treze (59,1%) faziam uso de medicamento corticoide e 54,5% (12 pacientes) possuíam comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (9 pacientes), diabetes (2 paciente) e depressão (1 paciente).

**Figura 5 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com artrite reumatoide na sorologia para detecção de anticorpos anti-*Strongyloides* utilizando antígeno MTL (pacientes positivos estão apresentados acima da linha pontilhada)**



Fonte: Os autores

Este trabalho se destaca por ser o primeiro a ser realizado buscando correlacionar pacientes com artrite reumatoide e a detecção de anticorpos específicos anti-*Strongyloides*. Os resultados encontrados neste estudo refletem a principal hipótese, que versa sobre a frequência importante de anticorpos em pacientes com doenças crônicas, sobretudo nos que venham a utilizar medicamentos corticoides dado o caráter inflamatório da doença.

Houve diferença estatística significativa entre os pacientes diagnosticados como positivos e negativos em ambos os antígenos utilizados, além de uma correlação estatisticamente significativa entre os antígenos utilizados neste estudo. Estes dados apontam e reforçam os achados que a literatura tem abordado <sup>22</sup> e direcionam o olhar para o diagnóstico parasitológico ou sorológico da estrogiloidíase.

O diagnóstico da estrogiloidíase é baseado em técnicas parasitológicas, sobretudo aquelas que possuem o termohidrotropismo larvário positivo como fundamento <sup>23-25</sup> ou por técnicas de cultura como a placa de ágar.<sup>26-27</sup>

Entretanto, quando realizadas isoladamente, apresentam baixa sensibilidade, principalmente pela intermitência na liberação larvária e baixa carga parasitária nos casos crônicos, sendo necessárias coletas de múltiplas amostras fecais ou associação entre técnicas parasitológicas. Estes métodos não costumam ser adotados na rotina laboratorial dada a quantidade de amostra fornecida e o incorreto estado de conservação, como refrigeração e utilização de substâncias conservantes.<sup>28-29</sup>

Diante dos problemas enfrentados na detecção direta de formas parasitárias de *S. stercoralis*, a literatura vem propondo medidas alternativas de diagnóstico que não dependam diretamente da liberação e detecção das larvas nos materiais biológicos. O desenvolvimento de técnicas sorológicas e moleculares, cada vez mais aprimoradas, vem sendo o objeto de estudo de diversos grupos pelo mundo. De forma geral, os valores dos parâmetros de diagnósticos das técnicas sorológicas sobressaem os das moleculares.<sup>30-31</sup>

#### **4 CONCLUSÃO**

O presente estudo reforça a necessidade da triagem sorológica para pacientes com doenças crônicas, sobretudo nos que realizam corticoterapia.

## REFERÊNCIAS

1. Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*. 2011;138(11):1331-40.
2. Corral MA, Gonçalves ALR, Costa IN, Abdala E, Pierrotti LC, Chieffi PP, et al. Immune complexes as a tool for strongyloidiasis immunodiagnosis in kidney and liver transplant candidate. *Parasite Immunol.* 2022;44(7):e12920.
3. Corral MA, Paula FM, Meisel DMCL, Abdala E, Costa SF, Pierrotti LC, et al. IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients. *Acta Trop.* 2019;190:357-360.
4. Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol.* 2013;53:158–83.
5. Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020; 9(4):880.
6. Ayin AAN, Pinho RS, Koyama RVL. Perfil clínico e epidemiológico e comorbidades dos pacientes com artrite reumatoide atendidos no centro de especialidades médicas do centro universitário do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2022;20:69–77.
7. Goeldner I, Skare TL, Reason ITM, Utiyama SRR. Rheumatoid arthritis: a current view. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2011;47:495–503.
8. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*. 2021;10(11):2857.
9. Santana AAT, Loureiro MB. Hyperinfection syndrome and/or dissemination by *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed patients. *RBAC*. 2017;49(4):351-8.
10. Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev. Patol. Trop.* 2006;35(3):173-84.
11. Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DMCL, Chieffi PP, Gryscek RCB. Frações de membrana de *Strongyloides venezuelensis* no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2015;57:77–80.
12. Toledo B, Corral MA, Meisel DMCL, Gottardi M, Abdala E, Costa SF, et al. Clinics. Screening of *Strongyloides* infection using an ELISA test in transplant candidates. 2019;74:e698.
13. Costa IN, Bosqui LR, Corral MA, Costa-Cruz JM, Gryscek RCB, Paula

FM. Diagnosis of human strongyloidiasis: Application in clinical practice. *Acta Trop.* 2021;223:106081.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-75.

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

16. Mineo JR, Silva DAO, Sopelete MC, Leal GS, Vidigal LHG, Tápia LER, et al. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU; 2005. 273 p. ISBN: 978-85-7078-523-7.

17. Doerzapff CC, Ferreira CES, Gomes LFO, Villela LHC, Vieira LMF, Shcolnik W. PALC - Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos: Norma 2013. AMB: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial; 2013. 48 p.

18. Gonçalves AL, Nunes DS, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology.* 2012;139(7):956-61.

19. Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MR, Gonçalves AL, Rodrigues RM, Ueta MT, et al. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;67(2):153-61.

20. Fonseca PDM, Corral MA, Cosenza-Contreras M, Meisel DMCL, Melo GB, Antunes MMS, et al. Shotgun proteomics of *Strongyloides venezuelensis* infective third stage larvae: Insights into host-parasite interaction and novel targets for diagnostics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2020;235:111249.

21. Roldán Gonzáles WH, Coelho GR, Pimenta DC, Paula FM, Gryscek RCB. Proteomic analysis of the excretory-secretory products from *Strongyloides venezuelensis* infective larvae: new insights for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitol. Res.* 2022;121(11):3155-3170.

22. Gryscek RCB, Corral MA, Sitta RB, Gottardi M, Pierrotti LC, Costa SF, et al. *Strongyloides* infection screening in transplant candidates: What is the best strategy? *Transpl. Infect. Dis.* 2023;25(6):e14153.

23. Baermann G. Eine einfache method zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Tijdschr Ned. Indie.* 1917;57:131-7.

24. Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Pública.* 1948;1(3):4507-4624.

25. Rugai E, Mattos T, Brisola A. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - modificação do método de Baermann. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 1954;14:5-8.
26. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. Am. J. Trop. Med. Hyg.. 1991;45:518–21.
27. Paula FM, Sitta RB, Malta FM, Gottardi M, Corral MA, Gryscek RCB, et al. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2013;55:141–3.
28. Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999;60(6):967-73.
29. Zaha T, Kinjo FH, Saito A. Strongyloidiasis: progress in diagnosis and treatment. Intern. Med.. 2000;39(9):695-700.
30. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. Acta Trop.. 2014;135:33-43.
31. Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl. Trop. Dis.. 2018;12:e0006229.