

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

MARESSA RHUAMA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE CAPTURA DE ANTÍGENO PARA
FILARIOSE LINFÁTICA UTILIZANDO ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA
RECOMBINANTE Wb14**

**RECIFE
2020**

MARESSA RHUAMA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE CAPTURA DE ANTÍGENO PARA
FILARIOSE LINFÁTICA UTILIZANDO ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA
RECOMBINANTE Wb14**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadores:

Dr. Abraham Rocha

Dr. André Filipe Pastor da Silva

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- S586a Silva, Maressa Rhuama.
Avaliação da eficácia de anticorpos contra rWb14 para o diagnóstico da filariose linfática / Maressa Rhuama Silva. — Recife: [s.n.], 2020.
67 p.: il., tab., graf.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologias em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto; coorientadores: Abraham Rocha, André Filipe Pastor da Silva.
1. Antígenos. 2. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 3. *Wuchereria bancrofti*. 4. Filariose Linfática - diagnóstico. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Rocha, Abraham. III. Silva, André Filipe Pastor da. IV. Título.

MARESSA RHUAMA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE CAPTURA DE ANTÍGENO PARA
FILARIOSE LINFÁTICA UTILIZANDO ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA
RECOMBINANTE Wb14**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Zulma Maria de Medeiros – Titular Interno
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana – Titular externo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça, misericórdia e amor infinitos derramados sobre mim ao longo de toda minha vida e abundantemente nesses dois anos de mestrado. Serei eternamente grata com minha vida e devoção.

A minha família, meus pais Manoel Carlos e Ironeide, e irmãs Larissa e Raissa, pelo amor, paciência, carinho e ânimo que sempre me passaram e por todo suporte que me deram a vida inteira, crucialmente nos tempos do mestrado.

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio, pelos ensinamentos e confiança, por ter me acolhido no laboratório e principalmente concordado em trabalhar com FL sendo sempre disponível para me orientar. Ao meu co-orientador Dr. Abraham Rocha por todo conhecimento, e pelos vermes cedidos que enriqueceram de forma crucial o meu trabalho. E em especial ao Dr. André Pastor, por toda paciência, conhecimento, disponibilidade, oportunidade, força, confiança, obrigada por tudo que fez por mim nesses 4 anos que trabalhamos juntos, sou eternamente grata.

Aos meus amigos por todo apoio, oração, risadas e principalmente pelos ouvidos disponíveis na hora de desabafo.

A todos meus colegas de laboratório pela disposição e auxílio nos experimentos, bem como pra me ensinar sobre como fazer ciência de maneira excelente.

De forma especial ao meu grupo Biomoltrip por todo conhecimento gerado em bancada e reuniões científicas.

As minhas amigas Stephanny, Yallen e Júlia por sempre serem um porto seguro pra me ancorar nos momentos de desespero, pelas risadas (que foram muitas), pelos lanches da tarde, pelas conversas e por absolutamente tudo.

A melhor secretária de departamento, Carol Pereira, por toda excelência e eficiência empregada no laboratório, por sempre estar disponível pra ajudar a todos e a mim de forma toda especial.

A todos os departamentos da FIOCRUZ, em especial a Microbiologia, e ao Núcleo de plataformas tecnológicas, pelos experimentos realizados.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias pelo conhecimento teórico, e a FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

RESUMO

SILVA, Maressa Rhuama. **Desenvolvimento de um teste de captura de antígeno para filariose linfática utilizando anticorpos contra a proteína recombinante Wb14**. 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

A Filariose Linfática (FL) é uma parasitose endêmica de regiões tropicais e subtropicais, provocada pelos vermes nematóides *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* e transmitida pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*. Para o seu diagnóstico, o exame parasitológico é barato e eficiente, mas possui limitações devido à periodicidade noturna das microfilárias, o que diminui a sensibilidade. Sabe-se que as técnicas sorológicas são uma opção necessária, pois além de apresentarem elevada sensibilidade, não possuem limitação temporal. Em contrapartida, os testes sorológicos de captura de antígenos existentes no mercado apresentam custo elevado e não são espécie-específicos. O presente trabalho objetiva avaliar a eficácia de anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra o antígeno rWb14 de *W. bancrofti* para o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico para a FL. Primeiro, a proteína Wb14 recombinante (rWb14) foi expressa em *Escherichia coli*, purificada por cromatografia de afinidade e utilizada na purificação dos anticorpos policlonais por imunoabsorção. Para verificar a eficiência de reconhecimento dos anticorpos monoclonais e policlonais foi produzido o extrato do verme adulto de *W. bancrofti*. Primeiramente o extrato foi exposto aos anticorpos produzidos contra rWb14, porém não houve nenhum reconhecimento. Depois soros de pacientes positivos e negativos foram separados eletroforéticamente e expostos aos anticorpos monoclonais e policlonais para reconhecimento do antígeno filarial circulante, mas o resultado esperado não foi obtido. Após isso, um conjunto de soros de pacientes positivos para FL, detectaram no extrato uma nova banda diagnóstica de aproximadamente 14 kDa que será alvo de investigações posteriores. Ao mesmo tempo, um ensaio de ELISA de captura de antígeno foi padronizado utilizando diferentes combinações de anticorpos, que foi sensível no reconhecimento da rWb14 nas quatro condições analisadas. Este ELISA foi testado com soros de diferentes grupos de indivíduos, mas apenas dois soros de pacientes microfilarêmicos foram reconhecidos em apenas uma destas condições. Mais testes deverão ser realizados para determinar a real sensibilidade e especificidade desse teste frente a um número maior de amostras de soros.

Palavras-chave: Antígeno; Ensaio de Imunoabsorção Enzimática; *Wuchereria bancrofti*, Filariose linfática – diagnóstico.

ABSTRACT

SILVA, Maressa Rhuama. **Development of an antigen capture test for lymphatic filariasis using antibodies against the recombinant protein Wb14.** 2020. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

Lymphatic filariasis (FL) is an endemic parasitic disease in tropical and subtropical regions, caused by the nematode worms *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori* and transmitted by the *Culex quinquefasciatus* mosquito. For its diagnosis, the parasitological exam is cheap and efficient, but it has limitations due to the nocturnal periodicity of the microfilariae, which reduces the sensitivity. It is known that serological techniques are a necessary option, because in addition to being highly sensitive, they do not have time limitations. On the other hand, serological tests for the capture of antigens on the market have a high cost and are not species-specific. The present work aims to evaluate the efficacy of monoclonal and polyclonal antibodies directed against the *W. bancrofti* rWb14 antigen for the development of a new diagnostic test for FL. First, the recombinant Wb14 protein (rWb14) was expressed in *Escherichia coli*, purified by affinity chromatography and used to purify polyclonal antibodies by immunoabsorption. To verify the efficiency of recognition of monoclonal and polyclonal antibodies, an extract of the adult worm from *W. bancrofti* was produced. First, the extract was exposed to the antibodies produced against rWb14, but there was no recognition. Afterwards sera from positive and negative patients were electrophoretically separated and exposed to monoclonal and polyclonal antibodies for recognition of the circulating filarial antigen, but the expected result was not obtained. After that, a set of sera from patients positive for FL, detected in the extract a new diagnostic band of approximately 14 kDa that will be the target of further investigations. At the same time, an antigen capture ELISA assay was standardized using different combinations of antibodies, which was sensitive in recognizing rWb14 in the four conditions analyzed. This ELISA was tested with sera from different groups of individuals, but only two sera from microfilaraemic patients were recognized in only one of these conditions. More tests should be carried out to determine the real sensitivity and specificity of this test against a larger number of serum samples.

Keywords: Antigen; Enzyme Immunoabsorption Assay; *Wuchereria bancrofti*, Lymphatic Filariasis – diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plano de intervenção adotado pelo Programa Global de Eliminação da FL.	16
Figura 2 - Avaliação da distribuição mundial do tratamento em massa para FL.	17
Figura 3 - Número de indivíduos tratados com DEC e porcentagem de microfilarêmicos por ano na Região Metropolitana do Recife/PE, Brasil, no intervalo de tempo de 2003 até 2016.....	18
Figura 4 - Ciclo Biológico do parasita.....	20
Figura 5 - Vermes adultos e microfilárias de <i>W. bancrofti</i>	21
Figura 6 - Pacientes com linfedema causado pela infecção com o helminto <i>W. bancrofti</i>	23
Figura 7 - Curva de periodicidade das microfilárias de <i>W. bancrofti</i> no sangue periférico do hospedeiro humano.....	24
Figura 8 - Expressão em larga escala da proteína rWb14 fusionada a histidina.	41
Figura 9 - Purificação da proteína rWb14.	42
Figura 10 - Purificação dos anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a proteína Wb14.	43
Figura 11 - Anticorpos monoclonais anti-rWb14 1H10 e 3G8 purificados.	44
Figura 12 - Extrato proteico do verme adulto de <i>Wuchereria bancrofti</i>	45
Figura 13 - Western blot utilizando anticorpos policlonais para a detecção da rWb14 e da sua forma nativa no extrato proteico de <i>W. bancrofti</i>	46
Figura 14 - Western blot utilizando os anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 para a detecção da rWb14 e da sua forma nativa no extrato proteico de <i>W. bancrofti</i>	47
Figura 15 - Eficácia dos anticorpos policlonais frente ao antígeno Wb14 nativo no soro de paciente.....	48
Figura 16 - Eficácia dos anticorpos monoclonais frente ao antígeno Wb14 nativo no soro de paciente.....	49
Figura 17 - Western blot do extrato de <i>W. bancrofti</i> com pool de soros de pacientes MF e NE.	50
Figura 18 - Quatro combinações dos anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 e policlonais em ensaios de ELISA sanduíche anti-rWb14.....	51
Figura 19 - ELISA sanduíche anti-Wb14 com banco de amostras biológicas do SRNF/Fiocruz-PE.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DEC	Dietilcarbamazina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FL	Filariose linfática
FMP	Filtração em membrana de policarbonato
GE	Gota Espessa
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
KDa	Kilodalton
<i>LMW</i>	<i>Low molecular weight</i>
MF	Microfilária
mM	Milimolar
M	Molar
mL	Mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitros
Meio LB	Meio Luria Bertani
uL	Microlitro
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PGEFL	Programa Global de Eliminação de Filariose linfática
RPM	Rotações por minuto
RPMI + P/E	<i>Rothwell Park Memorial Medium</i> + Penicilina/Estreptomicina
rWb14	Antígeno recombinante Wb14
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecil Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TMB	Tetrametilbenzidina

TAS	<i>Transmission Assessment Survey</i>
ug	Micrograma por microlitro
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Epidemiologia da FL, situação atual e tendências	15
2.2	Ciclo biológico, agente etiológico e transmissão da FL	19
2.3	Aspectos clínicos da doença	21
2.4	Diagnóstico laboratorial da FL	23
2.4.1	Diagnóstico Parasitológico.....	23
2.4.2	Diagnóstico Imunológico.....	25
2.5	O antígeno Wb14	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivos específicos	34
5	METODOLOGIA	35
5.1	Expressão da proteína recombinante Wb14	35
5.2	Purificação da proteína recombinante Wb14	35
5.3	Purificação de anticorpos policlonais	36
5.4	Manutenção dos hibridomas em cultura e concentração de anticorpos monoclonais	37
5.5	Extrato protéico do verme adulto de <i>Wuchereria bancrofti</i>	37
5.6	Eletroforese em gel SDS-PAGE	37
5.7	Western blotting	38
5.8	ELISA sanduíche para detecção da rWb14	39
5.9	Aspectos éticos	39
5.10	Detecção do antígeno filarial circulante Wb14 no soro dos pacientes	39
5.11	Análises estatísticas	41

6	RESULTADOS.....	40
6.1	Expressão da proteína rWb14.....	41
6.2	Purificação da rWb14 por IMAC	41
6.3	Purificação dos anticorpos policlonais contra rWb14.....	42
6.4	Concentração dos anticorpos monoclonais contra rWb14.....	43
6.5	Produção do extrato protéico de <i>Wuchereria bancrofti</i>	44
6.6	Detecção da rWb14 e da Wb14 no extrato proteico do verme adulto de <i>W. bancrofti</i> pelos anticorpos policlonais.....	45
6.7	Detecção da Wb14 nativa no soro de paciente microfilarêmico pelos anticorpos anti-rWb14.....	47
6.8	Reconhecimento da rWb14 e da Wb14 nativa no extrato protéico de <i>W. bancrofti</i> pelos anticorpos do soro de pacientes microfilarêmicos.....	49
6.9	Curva de detecção do antígeno rWb14.....	54
6.10	ELISA sanduiche para a detecção de antígeno nativo Wb14 circulante nos soros dos pacientes.....	51
7	DISCUSSÃO.....	52
8	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A Filariose Linfática (FL) é uma doença causada por vermes nematóides das espécies *Brugia malayi*, *Brugia timori* e *Wuchereria bancrofti*, com ciclos de vida heteróxeos e que é transmitida predominantemente pelo mosquito *C. quinquefasciatus* em regiões tropicais e subtropicais. Esta parasitose é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo, pois 120 milhões de indivíduos estão infectados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 850 milhões de pessoas em 52 países do mundo permanecem ameaçadas por FL e requerem quimioterapia preventiva para impedir a propagação desta infecção. Esta doença é a segunda causa de incapacidade permanente, afetando as pessoas que possuem as formas crônicas da doença, hidrocele e linfedema, levando esses pacientes a exclusão social, problemas psicológicos e até invalidez. Em 1993, a OMS elegeu a FL como uma das seis doenças infecciosas potencialmente erradicáveis e, em 2000 foi lançado o Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), que visa à eliminação da transmissão da doença até o ano de 2020. A falta de saneamento básico, alta densidade populacional e alta população de insetos transmissores nos países endêmicos são fatores que dificultam com o controle e extinção dessa endemia.

A dificuldade da coleta de amostras para a realização do exame, que deve ser entre 23h – 01h a fim de aumentar a sensibilidade do teste, é um dos grandes entraves para o diagnóstico parasitológico da FL e o seu controle. Como alternativa aos exames parasitológicos foram então desenvolvidos diagnósticos que pesquisam antígenos e anticorpos no sangue do paciente. De uma forma geral, a amostra pode ser coletada e analisada em qualquer horário do dia, como nos testes ELISA Og4C3, ELISA BM14 e cromatografia POC-ICT que estão disponíveis no mercado. Entretanto, a grande desvantagem é que estes testes não são espécie-específicos bem como não são fabricados no Brasil, gerando ônus aos cofres públicos. Além do mais, apresentam persistência da antigenemia positiva e problemas na reprodutibilidade dos resultados. Apesar de já estarem bem estabelecidos no mercado, ainda não existe um diagnóstico 100% eficaz, o que motiva pesquisas com intuito de produzir um teste de captura de antígenos mais sensível e específico.

O presente trabalho teve então como objetivo desenvolver um teste de captura de antígenos para o diagnóstico da FL baseado em um ensaio de ELISA sanduíche, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais produzidos contra a proteína rWb14 de *W. bancrofti*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A Filariose Linfática (FL), Bancroftose, Filaríase de Bancrofti ou popularmente conhecida como elefantíase é uma parasitose endêmica de regiões tropicais e subtropicais (BRASIL, 2009, PRADO et al., 2018, Organização mundial de Saúde, 2012, Organização mundial de Saúde, 2016). Esta doença é causada por vermes nematóides da superfamília *Filariodidea* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019), que apresenta três espécies distintas: *Brugia malayi* e *Brugia timori* causadoras da doença em 10% dos casos; e *Wuchereria bancrofti*, agente principal de infecção com 90% dos casos, e o único destes helmintos presente no Brasil (JONGTHAWIN et al., 2020, DE SOUZA et al., 2017, SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

Identificada como a segunda maior causa de incapacidades físicas permanentes ou de longo prazo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010), a FL ainda é fator de risco para aproximadamente 893 milhões de pessoas em 49 países endêmicos (JONGTHAWIN et al., 2020, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020). Além disso, estima-se que em torno de 40 milhões de pessoas no globo são portadoras das duas formas crônicas mais prevalentes da doença, a hidrocele e o linfedema (KOUDOU et al., 2018, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Por ser uma doença extremamente silenciosa, aproximadamente dois terços da população infectada não apresentam sintomatologia aparente. O restante dos infectados sofre das manifestações crônicas da FL: linfedema crônico, elefantíase e hidrocele. Indivíduos acometidos da fase crônica da FL têm sérios efeitos sociais e econômicos sendo frequentemente pobres e marginalizados socialmente. Além disso, a incapacidade crônica tem impacto na redução da produção econômica e no aumento da pobreza (JOHNSON et al., 2016, OTTESEN, 2000). A FL juntamente com outras doenças tropicais negligenciadas tem sido descritas como severos contribuintes para o fardo global de enfermidades na África. São elas que deixam os indivíduos imunocomprometidos, e consequentemente mais suscetíveis ao HIV/AIDS, tuberculose e malária, particularmente mulheres e crianças (JOHNSON et al., 2016)

A Força Tarefa Internacional identificou a FL como uma doença infecciosa potencialmente erradicável do mundo. Em virtude dessa análise, a FL foi eleita como alvo de eliminação pela OMS, que criou o Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL). Este foi aprovado em 1997 pela 50ª Assembléia Mundial da Saúde em virtude do

preocupante impacto médico, social e econômico desta doença (KUMAR; KUMAR; SETH, 2015, WON et al., 2018).

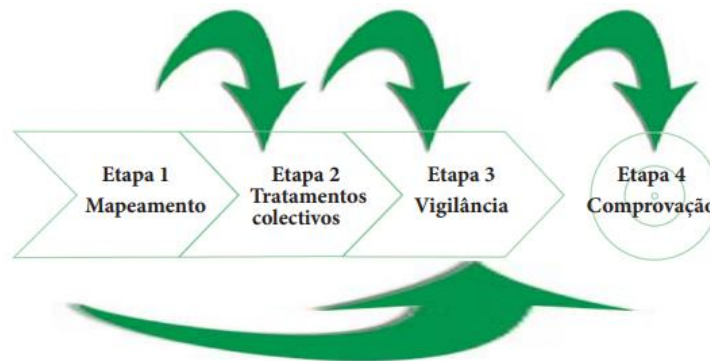
2.1 Epidemiologia da FL, situação atual e tendências

Em 1996, a OMS estimou que existiam cerca de 120 milhões de pessoas infectadas com FL, e que aproximadamente 40 milhões de pessoas possuíam algum grau de desconfiguração corporal, mais especificamente 25 milhões de homens com doença genital (hidrocele é a mais comum) e perto de 15 milhões de pessoas com linfedema ou elefantíase no membro inferior. Hoje em dia, pelo menos 36 milhões de pessoas permanecem com essas manifestações de doenças crônicas. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020, KUMAR; KUMAR; SETH, 2015).

O PGEFL quando foi criado, visava eliminar a transmissão da doença até o ano de 2020 (WHO, 2014). Ele apresenta duas vertentes: a interrupção da transmissão e prevenção e alívio do sofrimento dos portadores de morbidade. Para ocorrer a quebra da transmissão é administrado o tratamento coletivo da população de áreas de risco, que precisam ter prevalência igual ou superior a 1% de microfilaremia (Técnica de gota espessa) ou antigenemia (POC-ICT). O tratamento que a OMS preconiza é dietilcarbamazina (DEC) isolada ou associada a ivermectina ou albendazol, aplicada em dose única anual durante quatro a seis anos cobrindo 80% da população-alvo (ROCHA et al., 2010). Além disso, propõe o controle dos casos de pacientes tratados portadores de morbidade filarial, com lesões e sequelas em decorrência da doença (GYAPONG et al., 2018, MOLYNEUX, 2003, MOLYNEUX; ZAGARIA, 2002, OTTESEN, 2000).

Para implementar e monitorar o tratamento coletivo (TC) existem quatro estratégias: a primeira consiste no mapeamento da região, o resultado vai determinar se está havendo transmissão ativa e se é necessário a administração das drogas na população. O próximo passo compreende em administrar os medicamentos na população, bem como monitorar a sua implementação; avaliar as áreas sentinelas antes da primeira, quarta (opcional) e sexta aplicação do TC, estabelecendo a efetividade da intervenção; e implementação de um inquérito para avaliação da transmissão (TAS) após a sexta ronda do TC. O estágio três é a vigilância dos níveis de infecção por FL durante 5 anos após o término do TC. E a quarta e última fase é a comprovação da eliminação, ela consiste em uma análise detalhada das evidências epidemiológicas da ausência da transmissão (Figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Figura 1 - Plano de intervenção adotado pelo Programa Global de Eliminação da FL.



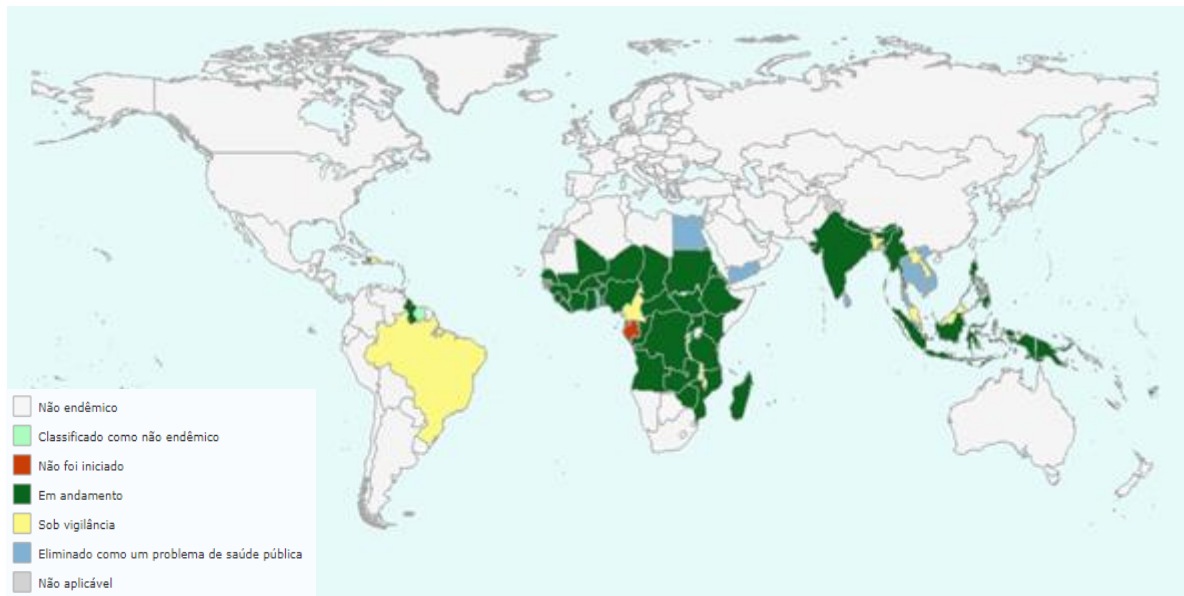
Fonte: Organização Mundial da Saúde (2011).

Legenda: Etapas do monitoramento e avaliação epidemiológica da intervenção com tratamentos coletivos para FL preconizado pela OMS.

Quando o PGEFL entrou em vigor cerca de 81 países eram endêmicos pra FL, mas atualmente dezesseis países e territórios conseguiram eliminar a FL como problema de saúde pública da sua população, são eles: Camboja, Ilhas Cook, Egito, Kiribati, Maldivas, Ilhas Marshall, Niue, Palau, Sri Lanka, Tailândia, Togo, Tonga, Vanuatu, Vietnã, Wallis e Fortuna e Iêmen. Além desses, outros 7 países já interromperam o tratamento em larga escala e a população se encontra sob vigilância epidemiológica (figura 2) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

De 2000 até 2018, o PGEFL conseguiu distribuir 7,7 bilhões de medicamentos a mais de 910 milhões de pessoas pelo menos uma vez em 68 países, gerando drástica redução da transmissibilidade da doença. A população dependente de MDA diminuiu em 42% (de 910 para 597 milhões). Esses números mostraram que os tratamentos entregues em 2015 evitaram perdas econômicas estimadas em bilhões de dólares. Apesar dos números favoráveis, a quimioterapia ainda é primordial em 49 países, mas infelizmente não foi distribuída em todas as áreas endêmicas até o fim de 2018 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

Figura 2: Avaliação da distribuição mundial do tratamento em massa para FL.



Fonte: Adaptado de: Organização Mundial de Saúde (2019).

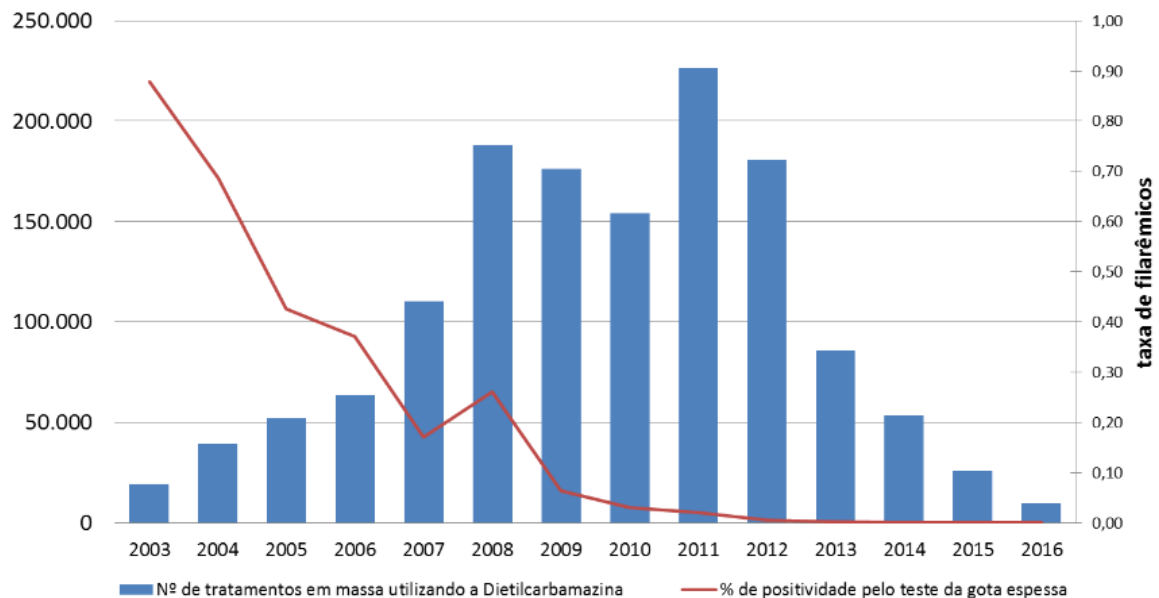
Legenda: O mapa acima mostra a situação atual do PGEFL ao redor do mundo. Países com a cor vermelha mostram que ainda não foi dado início ao tratamento em massa da população. Em verde são sinalizados os territórios que as pessoas continuam sendo tratadas. Em amarelo os países que estão em fase de eliminação, onde já houve interrupção do tratamento em massa. Em azul, mostra os lugares que já alcançaram sucesso e eliminaram a FL como problema de saúde pública.

No Brasil, o Ministério da Saúde usou como modelo o PGEFL e traçou seu próprio plano de eliminação da FL: o Plano nacional de Eliminação da Filariose Linfática no Brasil (PNEFL). A estratégia para o tratamento em massa foi a seguinte: uma vez confirmada na população alvo uma antigenemia ou microfitemia acima de 1% nos indivíduos testados, a aplicação de DEC com a dose preconizada pela OMS (6mg/kg em dose única anual) seria repetida por quatro a seis anos. A quantidade de medicamento a ser administrado variava conforme a idade, com base no cálculo de peso estimado para cada média de idade. Indivíduos acima de 4 anos de idade são selecionados para o tratamento, ressaltando que pessoas abaixo de 4 anos, maiores de 65 anos, mulheres grávidas e em período de lactação, e indivíduos com doenças crônicas não são elegíveis para o tratamento (ROCHA et al., 2010).

Após o término da abordagem medicamentosa é realizada a pesquisa TAS (*Transmission Assessment Survey*), que serve para assegurar que não haja reincidência da doença baseando-se em fazer três inquéritos para verificação em cada área submetida após o término no MDA com intervalos de dois anos, para assegurar que não haja retorno da infecção (VIGILÂNCIA, 2016).

Pernambuco é único estado do Brasil que ainda é considerado endêmico, mais especificamente na Região Metropolitana do Recife (RMR): Recife, Olinda, Paulista e Jaboatão dos Guararapes. As cidades de Belém (PA) e Manaus (AM), bem como Salvador (BA) e Maceió (AL) eram consideradas endêmicas no passado, no entanto hoje é evidenciada a ausência de indivíduos portadores de microfilárias (ROCHA et al., 2010, FONTES et al., 2012, BRASIL, 2017, DA SILVA JUNIOR et al., 2017; VIGILÂNCIA, 2016). A TAS ainda está sendo realizada no estado de Pernambuco, e os resultados obtidos até o presente momento são satisfatórios e indicam a possível eliminação da doença (figura 3). Mesmo que não sejam detectados novos casos na vigilância até 2021, é necessário manter a pesquisa tendo em vista a migração constante de indivíduos oriundos de outras regiões endêmicas (VIGILÂNCIA, 2016).

Figura 3: Número de indivíduos tratados com DEC e porcentagem de microfilarêmicos por ano na Região Metropolitana do Recife/PE, Brasil, no intervalo de tempo de 2003 até 2016.



Fonte: Ministério da saúde (2020).

Legenda: O gráfico apresenta a variação de indivíduos infectados por *W. bancrofti* ao longo dos anos, onde pode-se visualizar que ao longo dos anos a taxa de indivíduos infectados decresceu, à medida que o tratamento abrangeu uma maior parte da população. Nota-se que no ano de 2014, a taxa de positividade para gota espessa aproximou-se de 0%.

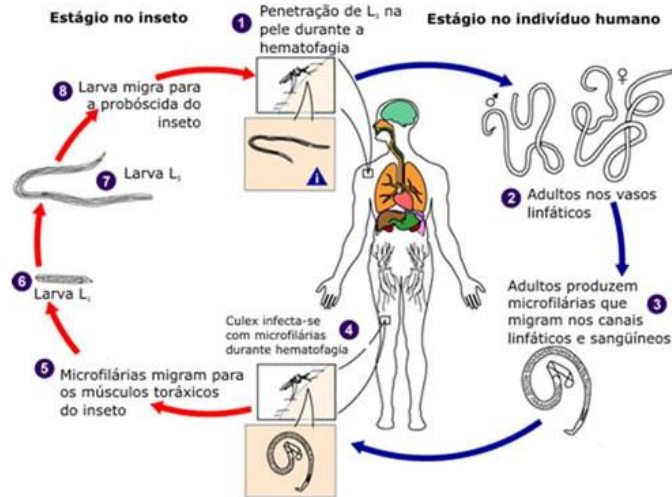
Apesar dos bons indicadores relatados imediatamente acima, um estudo observou que nos últimos cinco anos, o Brasil vem fazendo parte da trajetória de imigrantes de alguns países do continente Africano (Senegal, Gâmbia, Gana), da América Central (República Dominicana e Haiti), no Caribe e Ásia (Bangladesh e Índia), áreas de transmissibilidade ativa da FL bancroftiana. Estima-se que no período 2010-2014 aproximadamente 42 mil imigrantes

da República Dominicana, Haiti e África instauraram-se em terras brasileiras, onde a principal porta de entrada é a cidade de Rio Branco, capital do Acre. Esse trabalho concluiu que cerca de 4% dos imigrantes analisados apresentaram positividade no teste AD12-ICT, além de confirmação através da visualização de microfilárias no sangue periférico, antígeno, anticorpos e PCR positivos. Tais resultados anunciam a necessidade de ação imediata em medidas de controle de imigração (NUNES et al., 2016).

2.2 Ciclo biológico, agente etiológico e transmissão da FL

A *W. bancrofti* é um verme parasita que necessita de ao menos dois hospedeiros para completar seu ciclo heterógeno: o mosquito (invertebrado) e o homem (vertebrado). Os mosquitos são hospedeiros intermediários e carregam o verme no estágio larval, que é subdividido em três fases: L1, L2 e L3. O homem é o hospedeiro definitivo, onde as larvas amadurecerão em filárias ou vermes adultos de ambos os sexos e produzirão as microfilárias (CHANDY et al., 2011, FONTES et al., 2005). Ao fazer o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, a fêmea do mosquito vetor ingere as microfilárias que perdem suas bainhas e seguem para o estômago e logo depois para os músculos torácicos. Em seguida, sofrem as mudas larvais até se transformarem em larvas infectantes L3, que migram para a proboscídea do mosquito e permanecem lá até novo repasto (CDC, 2019). Quando isso acontece, essas larvas penetram num novo hospedeiro através da solução de continuidade provocada pela picada do mosquito, ganham a corrente sanguínea e migram para os vasos linfáticos. Neste local, vão amadurecer em vermes adultos, evoluindo para machos ou fêmeas. A cópula se dá no sistema linfático e as fêmeas geram milhões de embriões, as microfilárias (BRASIL, 2009) (figura 4).

Figura 3: Ciclo Biológico do parasita.



Fonte: Adaptado de CDC (2019).

Legenda: O mosquito vetor infectado deposita larvas L3 em um hospedeiro. Estas migram para os vasos linfáticos onde se tornarão vermes adultos e produzirão as microfílarias (MF) que migram para o sangue periférico. Quando o vetor faz o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ingere as microfílarias que amadurecem até se tornarem novas larvas L3.

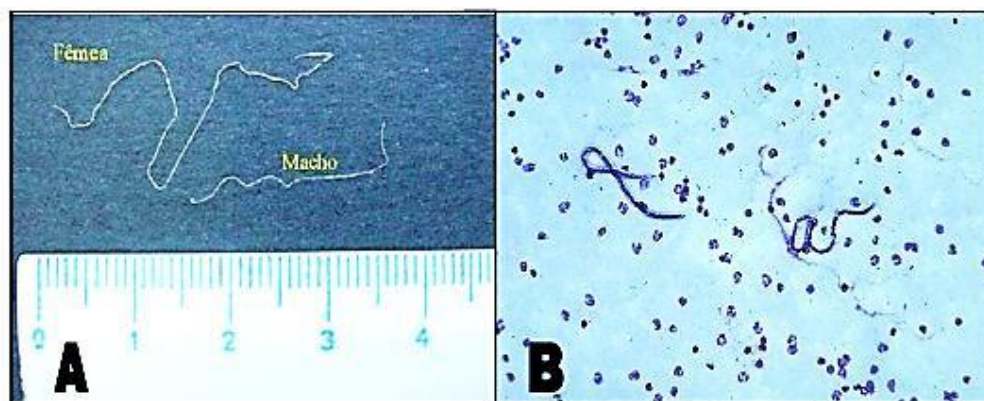
Os vermes adultos da *W. bancrofti* apresentam corpo longo e delgado de coloração branco leitosa e aspecto opaco (NEVES, 2005) (figura 5A). A fêmea é maior e mais espessa, apresentando um comprimento que varia de 80 a 100 mm de comprimento e 0,24 a 0,30 mm de diâmetro, enquanto os machos medem cerca de 40 mm por 0,1 mm, apresentando extremidade anterior afilada e posterior enrolada ventralmente (CDC, 2019; FONTES; ROCHA, 2005). O habitat natural desses helmintos são os linfonodos e vasos linfáticos do hospedeiro, onde podem ser encontrados enrolados fazendo movimentos contínuos e provocando reação inflamatória, bem como perturbando a circulação da linfa. Esses vermes tem longevidade desconhecida, mas estima-se que vivem em média 4 a 8 anos no sistema linfático (BRASIL, 2009, FONTES; ROCHA, 2005).

As microfílarias são as formas embrionárias da *W. bancrofti*, medindo cerca de 244 a 296 µm e possuindo uma bainha cuticular lisa, o que favorece o movimento delas na corrente sanguínea após serem despejadas na circulação pelas fêmeas adultas. A bainha ajuda no diagnóstico diferencial em relação às outras microfílarias das espécies *B. malayi* e *B. timori*, já que são o alvo da pesquisa no teste laboratorial parasitológico (NEVES, 2005, ROCHA et al., 2004) (figura 5B). Após alguns meses elas ganham a circulação linfática do hospedeiro, onde passam a se movimentar ativamente e lá se transformam em vermes adultos. As microfílarias possuem uma característica peculiar, a periodicidade noturna: durante o dia se localizam nos capilares profundos, principalmente nos pulmões e, durante a noite aparecem

no sangue periférico com maior concentração em torno da meia-noite, decrescendo novamente até o final da madrugada, independente da densidade parasitária (microfilaremia) do hospedeiro (BRASIL, 2009).

A infecção filarial acontece quando as fêmeas dos mosquitos fazem o repasto sanguíneo no indivíduo alvo, infectando-o com larvas que se transformam em vermes adultos (BRASIL 2009, BRASIL, 2017, KOMORENG et al., 2017, MISHRA et al., 2014). A transmissão do parasita é feita por uma diversidade de mosquitos que variam dependendo da área geográfica. Na África, os mais comuns são do gênero *Anopheles* enquanto que nas Américas o vetor mais comum é o *C. quinquefasciatus*. No oriente, mais especificamente no Pacífico e na Ásia, espécies dos gêneros *Aedes* e *Mansonia* podem transmitir a infecção, e além desses o gênero *Ochlerotatus* também é responsável pela transmissão (DORKENOO et al., 2018). Fatores como saneamento básico precário, condições ambientais favoráveis (clima quente e úmido), além de uma alta densidade local de indivíduos microfilarêmicos, tendem a aumentar a transmissibilidade da FL (RAWLINSON et al., 2014).

Figura 4: Vermes adultos e microfilárias de *W. bancrofti*.



Fonte A: BRASIL (2009); **Fonte B:** ROCHA et al., (2004)

Legenda: A- Vermes adultos de *W. bancrofti*; B- Microfilárias encontradas no esfregaço sanguíneo

2.3 Aspectos clínicos da doença

Após ser infectado pelo helminto *W. bancrofti* o indivíduo afetado passa por um período pré-patente, que ocorre entre a infiltração das larvas até o aparecimento das microfilárias no sangue periférico. Geralmente esses indivíduos são assintomáticos, porém uma doença subclínica pode ser desenvolvida causando comprometimento dos vasos linfáticos e danos renais (BRASIL, 2017, FONTES et al., 2005, ORGANIZAÇÃO

MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). A presença dos vermes adultos na linfa do hospedeiro é a causa das manifestações clínicas da FL, associada à resposta imune contra os embriões presentes no sangue do indivíduo infectado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

No período agudo alguns pacientes apresentam ataques agudos conhecidos como Linfagite aguda filarial, que é causada devido à morte dos vermes adultos em decorrência do tratamento, outro sintoma é a dermatolinfoangioadenite aguda provocada em detrimento da dilatação dos vasos, bem como por reações inflamatórias promovidas por substâncias secretadas por vermes adultos que modulam o sistema imune do hospedeiro. Ambos sintomas apresentam sinais de inflamação no local afetado, e ingurgitamento das cadeias ganglionares adjacentes (SHENOY et al., 2008). Eosinofilia pulmonar tropical (EPT) e quilúria também são classificadas como manifestações agudas da FL, embora sejam menos frequentes que os outros sintomas, acometendo o sistema pulmonar e renal, respectivamente (NEVES, 2005; BRASIL, 2009).

Quando progride para a fase crônica a filariose é responsável por debilitar os pacientes acometidos, principalmente nos casos de linfedema, popularmente conhecido como elefantíase (Figura 6). Estudos demonstraram que é causado devido a repetição de episódios de dermatolinfangiadenite bacteriana. Em estágios avançados de linfedema a pele do indivíduo fica espessa e enrijecida, muitas vezes apresentando verrugas e pigmentação negra. Nesse estado, os pacientes encontram-se incapacitados de se locomover sozinhos e até mesmo de realizar suas necessidades pessoais (SHENOY; BOCKARIE, 2011; STOCKS; FREEMAN; ADDISS, 2015). A outra manifestação clínica da fase crônica é a hidrocele causada devido ao acúmulo de líquido na bolsa escrotal e pode progredir com o passar do tempo ou diminuir quando tratada com doxiciclina. Contudo, em geral, hidroceles avançadas requerem cirurgias (GORDON; JONES; MCMANUS, 2018, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

Figura 5: Pacientes com linfedema causado pela infecção com o helminto *W. bancrofti*.



Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, (2019).

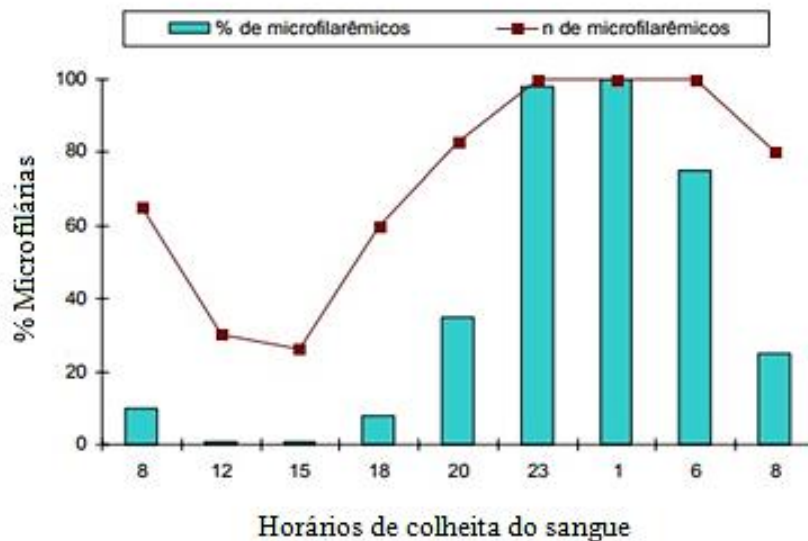
2.4 Diagnóstico laboratorial da FL

Apesar de existirem muitas maneiras de diagnosticar a FL, até agora nenhuma delas é totalmente eficaz, o que motiva diversas pesquisas científicas. Isso estimula o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico com a intenção de produzir testes mais seguros, rápidos e economicamente viáveis (ALHASSAN et al., 2015).

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

A identificação de microfilárias em esfregaços de sangue periférico e em outros fluidos biológicos é considerada o padrão ouro para confirmação da infecção filarial. Para pesquisá-las em amostras de sangue deve-se considerar a periodicidade destas microfilárias na corrente sanguínea de pacientes da região estudada, sendo no Brasil entre 23 h e 1 h (Figura 7) (BRASIL, 2009).

Figura 6: Curva de periodicidade das microfilárias de *W. bancrofti* no sangue periférico do hospedeiro humano.



Fonte: FONTES et al. (2000)

Legenda: Porcentagem de microfilaremia média presente no sangue periférico, e porcentagem de pacientes positivos no exame gota espessa quantitativa para microfilárias de *W. bancrofti*, em diferentes horários de coleta sanguínea ao longo do dia.

A gota espessa (GE) é a técnica mais utilizada no diagnóstico da FL por apresentar custo baixo e fácil processamento laboratorial. Para tal, com auxílio de lanceta uma punção é feita no dedo anelar na extremidade digital com o objetivo de depositar três gotas de sangue em uma lâmina. Em seguida, é realizada a coloração com Eosina-Giemsa para visualização de microfilárias em microscópio óptico. Entretanto, esta é uma técnica que possui baixa sensibilidade, podendo não identificar indivíduos com baixa microfilaremia ou amicrofilarêmicos (BRASIL, 2009; ROCHA, 2000; WITT; OTTENSEN, 2001; FONTES; ROCHA, 2005).

Outra metodologia utilizada é a filtração em membrana de polycarbonato (FMP), que é considerada o “padrão ouro” quando se trata de investigação e quantificação da microfilaremia antes, durante e após o tratamento. Para realizar essa técnica um volume sanguíneo de 1 a 10 mL é filtrado através de uma membrana para reter as microfilárias, aumentando assim a sensibilidade tanto por causa do maior volume sanguíneo, quanto por concentrar as estruturas possivelmente existentes. Entretanto, os casos de amicrofilaremia ainda não serão detectados (MELROSE, 2002, FONTES; ROCHA, 2005, BRASIL, 2009).

A técnica de concentração de Knott (CK) favorece a visualização das microfilárias a partir da utilização de formalina, que visa aumentar a sensibilidade do exame. Este consiste

em diluir o sangue na proporção de 1:10 com formol a 2% e após centrifugação, gotas espessas são preparadas com o sedimento para pesquisa das microfilárias. Entretanto, esta metodologia é amplamente substituída pela FMP (BRASIL, 2009).

Existe ainda o diagnóstico por imagem, baseado na pesquisa de vermes adultos em vasos linfáticos escrotais através de ultrassonografia (AMARAL, 1994). Esses vermes são evidenciados através do movimento de “dança das filárias”, característico desses helmintos (NORÕES, 1996). Esse método de investigação da FL é importante por não ser invasivo e por permitir a identificação precoce da infecção filarial. Além disso, é essencial no monitoramento do tratamento, pois avalia se houve redução de vermes adultos nos vasos linfáticos após terapia anti-filarial (ROCHA et al., 2009).

2.4.2 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico da FL tem duas vertentes: ele pode se basear tanto na pesquisa de antígenos como de anticorpos circulantes. A principal vantagem desses métodos é que o sangue do paciente pode ser coletado em qualquer hora do dia, diferente dos métodos parasitológicos que necessitam de um horário específico (GORDON; JONES; MCMANUS, 2018). Vários estudos têm sido realizados em busca de novos biomarcadores bem como no intuito de melhorar a precisão dos testes sorológicos, através do aprimoramento da especificidade e sensibilidade na captura de antígenos e anticorpos.

2.4.2a Pesquisa de anticorpos circulantes

A produção de anticorpos é uma característica inerente a infecções parasitárias, inclusive para a FL (LAMMIE et al., 2004). O diagnóstico feito a partir da detecção de anticorpos no soro dos pacientes surgiu como uma alternativa de detectar a infecção filarial em indivíduos que tem baixa carga parasitária ou até mesmo daqueles que já tenham eliminado as microfilárias da circulação (ATHISAYA MARY et al., 2011). Esses ensaios são altamente sensíveis à infecção, entretanto, eles não conseguem diferenciar uma infecção passada de uma infecção atual ou da simples exposição ao parasita (LAMMIE et al., 2004). O advento dos antígenos recombinantes facilitou o desenvolvimento de diagnósticos sorológicos tanto por causa de sua especificidade e sensibilidade como pelo fato de serem facilmente produzidos em laboratório. Para facilitar a compreensão os diagnósticos citados abaixo serão divididos em comercial e pesquisa.

Testes disponibilizados comercialmente

O antígeno Bm14 é proveniente do estágio microfilarial da *B. malayi* e isolado de bibliotecas de cDNA e utilizado no desenvolvimento de ensaios diagnósticos devido a sua forte capacidade de reconhecer anticorpos contra o parasita, sobretudo da classe IgG4. Com uma sensibilidade de 85-90% quando testado em soros de indivíduos microfilarêmicos, também foi relatado que o Bm14 é sensível para indivíduos infectados por ambas as espécies *W. bancrofti* e *B. malayi* (CHANDRASHEKAR et al., 1994; LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 2011). Desenvolvido posteriormente, o CELISA (Cellabs Pty Ltd, Brookvale, NSW, Austrália) é então um ensaio de ELISA indireto no qual anticorpos de classe IgG4 disponíveis no soro dos pacientes reconhecem a proteína Bm14. Apesar da sua eficiência, não deve ser utilizado em áreas endêmicas da *Onchocerca volvulus*, pois existe reação cruzada (WEIL et al., 2011).

A proteína Wb123, expressa principalmente nos estágios larvais do verme, também se mostrou promissora ao ser rapidamente detectada pelos anticorpos IgG e IgG4 num ensaio do sistema de imunoprecipitação da luciferase (LIPS). Este ensaio apresentou 100% de sensibilidade e especificidade nos pacientes microfilarêmicos testados. Um ponto importante a ser considerado, foi que esses anticorpos só existiam em indivíduos infectados por *W. bancrofti*, não sendo reconhecidos por espécies parecidas das mesmas regiões geográficas como *O. volvulus*, *Loa loa* e *Mansonella perstans* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012). Em seguida, um ELISA e um teste da fita (*Strip*) foram desenvolvidos para Wb123. Os dois demonstraram sensibilidade e capacidade para o monitoramento da infecção filarial, apesar da reação cruzada com *O. volvulus* (STEEL et al., 2012).

O teste imunocromatográfico panFL RAPID (*Malaysian BioDiagnostics Research Sdn. Bhd*), desenvolvido utilizando os antígenos BmR1 e BmSXP, consegue detectar infecções tanto de *B. malayi* como de *W. bancrofti*, com sensibilidade e especificidade em torno de 96,5 e 99,6%, respectivamente (ABDUL RAHMAN; HWEN-YEE; NOORDIN, 2007). Este ensaio reconheceu anticorpos IgG4 em indivíduos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos, entretanto apresenta reação cruzada entre as duas espécies. Apesar de ser um teste em potencial, outros estudos com maior número de amostras devem ser realizados para sua validação (ATHISAYA MARY et al., 2011).

Testes em pesquisa

O antígeno BmSXP-1 foi isolado da mesma forma que o Bm14 citado anteriormente, entretanto quando testado só foi reativo para *W. bancrofti* (CHANDRASHEKAR et al., 1994;

LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 2011). Já o antígeno WbSXP-1 é sintetizado pelo gene ortólogo presente em *W. bancrofti* do gene SXP-1 oriundo da *B. malayi*. Tal antígeno foi utilizado no desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático anti-WbSXP-1 IgG4 ELISA, no qual 100% dos pacientes com infecção bancroftiana foram identificados. Vale ressaltar que pacientes endêmicos normais (são pessoas sem a doença que moram em regiões endêmicas) e portadores de patologia crônica não foram detectados neste estudo (RAO et al., 2000). Porém, apesar do progresso, ainda não foi comercializado nenhum teste de captura de anticorpo com esse antígeno.

Dando continuidade as análises da biblioteca de cDNA de *B. malayi*, o antígeno recombinante BmR1 foi selecionado e em ensaios de ELISA mostrou uma sensibilidade maior que 90% quando testado com amostras de soro de pacientes microfilarêmicos infectados com *B. malayi* e *B. timori* (LAMMIE et al., 2004). Esse antígeno também originou o teste cromatográfico Brugia Teste Rápido (*Brugia rapid dipstick test*), que reconhece anticorpos IgG4 presentes no soro de pacientes. Nos indivíduos testados, tanto microfilarêmicos quanto amicrofilarêmicos foram positivos, enquanto que indivíduos não endêmicos foram negativos. Além disso, também foi verificado que a infecção por *B. timori* é detectada por esse ensaio (SUPALI et al., 2004).

Mais recentemente, a proteína Wb14 oriunda de *W. bancrofti* também foi avaliada quanto ao seu potencial de reconhecimento por anticorpos no soro de pacientes com FL e foi verificada uma acurácia de 96,67%. Além disso, quando comparado ao CELISA, apresentou sensibilidade similar e especificidade superior. Entretanto, o ELISA anti-Wb14 precisa ser avaliado com amostras de soro de outros filarídeos e vermes próximos como *O. volvulus*, *Loa loa*, *B. malayi* e *B. timori* para verificar se existe reação cruzada entre esses vermes (PASTOR et al., 2018).

2.4.2b Pesquisa de antígenos circulantes

Quando se trata de diagnósticos de captura de antígeno, deve-se ter em mente que eles utilizam anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra antígenos dos vermes que circulam no soro dos pacientes (SMALL; TISCH; ZIMMERMAN, 2014).

Testes disponibilizados comercialmente

As técnicas sorológicas que fazem a detecção de antígenos disponíveis comercialmente são o teste Og4C3-ELISA (*Elabscience® ELISA Diagnosis / ISO Accredited ELISA Kits*) (MORE; COPEMAN, 1990) e o POC-ICT (*BinaxNOW, Binax, Inc., Maine,*

USA) (WEIL et al., 1997), atualmente substituído pela tira de teste de filariose (FTS) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Estes testes foram desenvolvidos durante a década de 90 e representaram um importante avanço no diagnóstico da FL (MORE; COPEMAN, 1990).

O teste Og4C3-ELISA (*JCU Tropical Biotechnology Pty. LTDA, Townsville, Queensland, Austrália*), utilizado em grandes demandas, baseia-se na técnica de ELISA do tipo sanduíche, a qual é empregada um anticorpo monoclonal de classe IgM, proveniente do verme bovino *Onchocerca gibsoni* (TropBio 1996). Os cientistas notaram que esse anticorpo reconhecia os antígenos de *W. bancrofti* existentes nas amostras de pacientes infectados (MORE & COPEMAN, 1990). Já o cartão POC-ICT e a FTS são produzidos utilizando o anticorpo monoclonal AD12.1, da classe IgG1, produzido a partir do extrato do verme *Dirofilaria imitis*. Os anticorpos no teste POC-ICT detectam no soro humano antígenos solúveis de *W. bancrofti* de até 200 kDa de tamanho, provenientes principalmente dos vermes adultos que habitam nos vasos linfáticos (SMALL; TISCH; ZIMMERMAN, 2014). Este diagnóstico foi produzido para ser aplicado em campo no PGEFL, devido a sua praticidade e sem necessidade de pessoas especializadas para realizá-lo. Evidências afirmam que o mesmo é 100% específico e altamente sensível, mas foi comprovado que existe reação cruzada com antígenos de *Loa Loa* em zonas endêmicas da África. Em áreas onde há apenas infecção por *W. bancrofti* isso não é um problema. O FTS (*The Alere Filariasis Test Strip*) foi desenvolvido pela mesma empresa que o POC-ICT (*Alere*) e verificou-se 99% de concordância entre os dois testes, mas o FTS teve maior sensibilidade em baixa antigenemia, além de ser mais vantajoso por ser mais barato e durável que o POC-ICT (GORDON; JONES; MCMANUS, 2018).

Testes em pesquisa

Apesar do Og4C3 e do cartão FTS já estarem estabelecidos no mercado, ainda não existe de fato um diagnóstico 100% eficaz, motivando várias pesquisas na área em busca de um melhor teste de captura de antígenos. Esses dois métodos possuem desvantagens como falta de estabilidade e especificidade, além de possuírem alto custo, por serem importados (RAVISHANKARAN et al., 2014).

Um trabalho pioneiro desenvolveu anticorpos policlonais contra as proteínas BmSXP-1 e WbSXP-1, mostrando ser competentes em reconhecer os antígenos nos soros de pacientes infectados com *B. malayi* e *W. bancrofti* (LALITHA et al., 2002). Soros de camundongos e coelhos anti-BmSXP-1 foram primeiro utilizados para desenvolver um ELISA sanduíche (LALITHA, 2002). Quando os soros de pacientes infectados com *W. bancrofti* e *B. malayi* foram testados, os indivíduos microfilarêmicos de ambas infecções apresentaram positividade semelhante. No entanto, quando outros grupos de pacientes foram testados, observou-se maior sensibilidade para Wb e maior especificidade para Bm (LALITHA, 2002). Mais recentemente, anticorpos monoclonais específicos contra o BmSXP foram otimizados com a tecnologia de *Phage Display* usada por dois trabalhos independentes (RAHUMATULLAH et al., 2015, OMAR; HAMIDON; YUNUS, [s.d.]) No primeiro, uma biblioteca imune de scFv foi gerada a partir do sangue de doadores infectados por LF, resultando em seis anticorpos monoclonais identificados contra o BmSXP (RAHUMATULLAH et al., 2015). Um destes clones (5B) foi utilizado em combinação com anti-BmSXP policlonal em sanduíche ELISA. Foi positivo para todos os soros 34/34 de pacientes com microfilariase bancroftiana (RAHUMATULLAH et al., 2019). O segundo estudo realizou a seleção e geração de anticorpos Fab contra BmSXP através da biblioteca de doadores de sangue da China, Índia e Malásia. Aqui, os oito clones obtidos foram expressos, purificados e analisados. Eles foram capazes de se ligar ao BmSXP, mesmo em sua forma solúvel, aumentando a possibilidade de sucesso em aplicações futuras (OMAR; HAMIDON; YUNUS, [s.d.]).

Quanto à proteína homóloga da BmSXP de *W. bancrofti*, a WbSXP, esta é reconhecida por anticorpos no soro dos pacientes infectados, tanto em infecções de *B. malayi* quanto de *W. bancrofti* (LALITHA, 2002; RAO et al., 2000). Entretanto, pelo o fato da pesquisa de anticorpos circulantes não assegurar se a infecção é ativa ou passada, optou-se por utilizar a WbSXP-1 para produção e avaliação de anticorpos monoclonais. No primeiro relato, pacientes com FL foram identificados por anticorpos monoclonais contra WbSXP-1, mas testes com relação a outros helmintos não foram realizados (JANARDHAN et al., 2011). Posteriormente, também houve produção de anticorpos monoclonais que detectaram de forma eficiente a proteína nativa de microfilárias, a proteína na sua forma recombinante bem como o antígeno circulante no soro de pacientes com FL (PANDEY et al., 2011).

Outra proteína alvo investigada para testes de captura de antígenos foi a Shp-1, que por ser abundantemente expressa na bainha microfilarial e também em vermes adultos,

poderia ser um importante indicador de infecção. A literatura relata que essa proteína possui papel na modulação imunológica apresentando uma resposta do tipo IgG4 nos indivíduos microfilarêmicos assintomáticos, enquanto que nos sintomáticos o tipo de resposta foi IgG1. O ensaio de captura de antígeno demonstrou que os indivíduos microfilarêmicos apresentaram maior reatividade, seguidos de indivíduos com patologia crônica e endêmicos normais, produzindo resultados semelhantes àqueles encontrados para o teste Og4C3. Além disso, foi demonstrado que este ensaio consegue detectar tanto infecções de *B. malayi* quanto de *W. bancrofti*, devido à similaridade da proteína Shp-1 nos dois vermes (JAWAHARLAL et al., 2014).

Em 2016, um ensaio imunoenzimático de captura de antígeno foi desenvolvido utilizando anticorpos produzidos contra as proteínas SXP-1, VAH e ALT-2. Várias combinações de anticorpos foram testadas e o conjunto SXP-1 e VAH reconheceu quase 100% de indivíduos microfilarêmicos portadores de infecção com *B. malayi* ou *W. bancrofti*. Esse ensaio tem capacidade de diferenciar indivíduos com infecção ativa daqueles com infecção crônica por meio da detecção de antígenos filariais circulantes (RAVISHANKARAN et al., 2016).

2.5 O antígeno Wb14

A proteína escolhida para o desenvolvimento de um teste diagnóstico de captura de antígeno proposto por esse trabalho foi a Wb14. Um estudo preliminar mostrou que este antígeno apresentou considerável reconhecimento antigênico pela IgG humana total em pacientes microfilarêmicos (PANDIARAJA et al., 2010a). Somado a isso, a proteína Wb14 recombinante foi mais recentemente avaliada em um ELISA de captura de anticorpos anti-Wb14 pela equipe ligada a este trabalho (PASTOR et al., 2018). Este ensaio demonstrou sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes Og4C3 e ICT e maior especificidade quando comparado ao teste comercial Bm14 CELISA, utilizado pelo Serviço de Referência Nacional em Filariose Linfática (SRNF-FIOCRUZ-PE). Apesar dos resultados promissores do ELISA anti-Wb14, é necessário analisar este antígeno frente a infecções com outros parasitas como *O. volvulus*, *L. loa*, *B. malayi* e *B. timori* para verificação de reação cruzada (PANDIAJARA et al, 2010a, PASTOR et al, 2018).

O primeiro relato da proteína Wb14 foi em uma análise do polimorfismo e conservação da estrutura da WbSXP-1, no qual foi descoberto que as duas diferiam pelo fato

da primeira possuir um códon de parada na posição 461 do gene. As duas proteínas compartilham 98% de homologia na sequência nucleotídica além de possuírem homologia aos genes SXP de parasitas associados, como *B. malayi* (Bm14 e SXP-1), *O. volvulus* (Ov17) e *Ascaris suum* (As14) (PANDIARAJA et al. 2010). A proteína Wb14 pertence a uma família de proteínas dos nematóides que são considerados fortes imunógenos em infecções parasitárias (RAO et al., 2000). A proteína recombinante originalmente avaliada apresentava 153 aminoácidos e peso molecular de 23 kDa (PANDIARAJA et al., 2010). Já a proteína avaliada no trabalho que precedeu esta proposta demonstrou um tamanho em gel desnaturante de poliacrilamida de 17 kDa (PASTOR et al., 2018), mas os dois trabalhos possuem diferenças no vetor de expressão utilizado.

Dada à necessidade de um teste que reconheça um indivíduo com infecção ativa, somado aos resultados promissores da Wb14 recombinante, esta surge como um alvo promissor para o desenvolvimento de um teste diagnóstico de captura de antígeno, sobretudo um teste espécie-específico nacional e de custo reduzido. Além de diminuir os gastos dos cofres públicos nacionais com a compra de insumos diagnósticos, contribuiria de forma mais econômica com o PGEFL na verificação de inquéritos populacionais.

3. JUSTIFICATIVA

No presente estudo, foi avaliado o potencial de reconhecimento da proteína rWb14 por anticorpos monoclonais e policlonais produzidos anteriormente para o desenvolvimento de um teste de captura de antígenos para o diagnóstico da FL provocada por *W. bancrofti*. Tal proteína ainda não foi explorada para o teste de captura de antígenos, e como visto anteriormente, a mesma apresentou resultados promissores quando usada no teste de captura de anticorpos (PANDIAJARA et al., 2010; PASTOR et al., 2018).

Desenvolver um teste diagnóstico para a FL é crucial para a vigilância epidemiológica e manejo clínico apropriado (VIGILÂNCIA, 2016). Diagnósticos sensíveis são importantes nesta fase de eliminação, dada à diminuição da microfilaremia nos pacientes acometidos. Os testes utilizados pelo PGEFL, ELISA Og4C3 e POC-ICT, são para capturar antígenos, entretanto não são espécie-específicos e permanecem apresentando resultados positivos por anos, até mesmo em pacientes curados (LAMMIE et al., 2004; MORE; COPEMAN, 1990; WEIL et al., 1997).

Outro fator importante a ser considerado é que por fazer parte da trajetória de imigrantes de alguns países endêmicos da África (Senegal, Gâmbia, Gana), Caribe e outros da América Central, como República Dominicana e Haiti, Ásia (Bangladesh e Índia), o Brasil pode voltar a ter áreas de transmissibilidade ativa da FL bancroftiana. Acredita-se que aproximadamente 42 mil imigrantes instauraram-se em terras brasileiras, onde a principal porta de entrada é a cidade de Rio Branco, Acre. Corroborando essa preocupação, um estudo concluiu que cerca de 4% dos imigrantes analisados apresentaram positividade em todos os diagnósticos para essa doença, alertando assim para a ação imediata da vigilância no controle migracional (NUNES et al., 2016). Um método diagnóstico brasileiro de custo reduzido facilitaria a disponibilidade de testes para triagem da população, além de diminuir gastos na compra de insumos.

E por último, o setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em Biotecnologia aparece como um setor favorável, quando se trata de avanços científicos e tecnológicos. O campo de produção diagnóstica é bastante dinâmico e movimentado no mundo cerca de 25 bilhões de dólares a cada ano (GADELHA et al., 2008). Os anticorpos monoclonais e policlonais avaliados aqui poderão ser utilizados em técnicas diagnósticas avançadas, e ainda ser aplicados em outras pesquisas do ramo. Tais avanços visam diminuir a dependência

tecnológica do Brasil no setor de imunodiagnóstico, assim como gerar avanço para a biotecnologia nacional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de anticorpos monoclonais e policlonais contra rWb14 para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para a Filariose linfática.

4.2 Objetivos específicos

- a) Produzir anticorpos monoclonais em larga escala e purificar anticorpos policlonais contra a rWb14;
- b) Produzir o extrato proteico do verme adulto *W. bancrofti*;
- c) Testar a eficiência dos anticorpos monoclonais, policlonais e do soro de pacientes positivos para FL em reconhecer o antígeno rWb14 e a Wb14 nativa no extrato proteico filarial;
- d) Padronizar um ELISA sanduíche para a detecção da rWb14;
- e) Testar o ELISA padronizado com o painel de soro de pacientes com filariose e controles do SRNF, IAM-FIOCRUZ-PE.

5. METODOLOGIA

5.1 Expressão da proteína recombinante Wb14

De acordo com PASTOR et al 2018, a sequência de aminoácidos da proteína Wb14 nativa foi identificada no banco de dados do *Broad Institute* e foi traduzida com a ajuda do programa Gene Designer 2.0. A sequência nucleotídica da proteína recombinante (rWb14) foi enviada para síntese comercial pela empresa GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) e clonada no vetor comercial de expressão pRSET-A (Invitrogen®) (PASTOR et al., 2018). Para sua expressão, bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* BL21 star (Invitrogen®) foram transformadas por choque térmico com a construção pRSET-A acrescido do gene da rWb14. Para expressar a proteína recombinante foi feita indução em larga escala, na qual foi utilizada uma alíquota de 100 µL da bactéria anteriormente transformada em 20 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (LB/Amp) na concentração de 50 ug/mL (pré inóculo). Tais bactérias foram mantidas durante a noite a 37°C sob agitação de 180 rpm. No dia seguinte, a cultura foi inoculada em 500 mL de meio LB/Amp e acompanhada sob aferição no espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir a densidade ótica de 0,6 (OD 600nm). Então, foi adicionado ao meio o indutor da síntese proteica, o IPTG (isopropil-β-D-tio-galactosídeo - Sigma-Aldrich®), a 100mM e o crescimento foi mantido por 2h30 minutos à 30°C e 180 rpm. A visualização da expressão da proteína foi feita através da eletroforese em gel de SDS-PAGE 20% (VESTERBERG, 1993).

5.2 Purificação da proteína recombinante Wb14

A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos/4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano ressuspensionado em 20mL de tampão de lise (50mM Tris-HCL, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 8,0), sendo então submetido a um processo de sonicação para garantir a lise das bactérias (6 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto). A purificação da rWb14 foi realizada através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), na qual uma resina de agarose com níquel imobilizado Ni-NTA-Agarose (Qiagen) separa as proteínas heterólogas do restante das moléculas produzidas pelas bactérias, devido à afinidade com a cauda de histidina adicionada pelo vetor (CHEUNG; WONG; NG, 2012). O produto sonicado foi incubado com 300 µL de resina sob agitação por uma hora à 4°C, e posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 5 min/4°C. Então, 100 µL do sobrenadante foi reservado e o restante descartado. Depois disso, o sedimento de proteína mais resina foi ressuspensionado com 500 µL de tampão de lavagem e

submetido a 5.000 rpm por 2 min, cinco vezes seguidas, para que todo contaminante fosse retirado e na última lavagem o sobrenadante foi guardado a -20°C. Subsequentemente, foi adicionado 500 µL de tampão de eluição, e a mistura foi incubada sob agitação à 4°C por uma hora, etapa que foi repetida por 30 minutos, sendo o eluato estocado à -80°C. Para confirmação da purificação da proteína rWb14, esta foi submetida a eletroforese em gel SDS-PAGE 20%.

5.3 Purificação de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais utilizados nesse trabalho foram obtidos previamente por PASTOR et al., 2017. Coelhos brancos saudáveis com cerca de três meses de idade foram primeiramente imunizados com uma solução contendo 25 µg da proteína administrada em combinação com 300 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma) por via subcutânea. Subsequentemente, foram realizadas 3 imunizações com intervalos de 15 dias, seguidas de sangria total. O soro dos coelhos foram aliqüotados e mantidos a -80° C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sob o número 49/2013. Para purificar os anticorpos foi necessário fracionar 150 µg da rWb14 em gel SDS-PAGE 20%, e transferi-la para uma membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno, Immobilon-P, Millipore Corporation) nas dimensões do gel. A membrana foi então corada com Ponceau S 0,2% (Sigma-Aldrich) em solução de ácido tricloroacético (1%) e a banda que corresponde à proteína rWb14 foi cortada em pequenos pedaços e posta em um tubo de 1.5 mL e depois submetida a três lavagens com PBS, durante 10 minutos cada. Subsequentemente, a membrana foi bloqueada com solução de leite 5% em PBS/Tween-20 0,5% durante 30 minutos a 4°C. A solução bloqueadora foi então removida e os segmentos da membrana foram submetidos a três lavagens com 1 mL de PBS/Tween-20 durante 10 minutos. Então, foram adicionados 1 mL de soro de coelho com os anticorpos policlonais específicos contra rWb14 (produzidos anteriormente). Os anticorpos permaneceram em incubação com os fragmentos da membrana por 48h à 4°C, sob agitação. Depois disso, os cortes foram novamente lavados três vezes com 1 mL de PBS/Tween 20 por 10 minutos. Então, os anticorpos ligados à membrana foram eluídos com 200 µL de solução de glicina-HCL 0,1 M, pH 2,5 em temperatura ambiente com forte agitação durante cinco minutos, seguido de centrifugação à 12.000 RPM durante dois minutos. O eluato contendo os anticorpos foi transferido para um novo tubo, neutralizado com 20 µL de tris-HCL 1M pH 8,0 e posteriormente armazenado em

alíquotas à -80°C. Para verificar o rendimento dos anticorpos purificados foi feita uma divisão da concentração final dos anticorpos dividido pelo volume inicial utilizado.

5.4 Manutenção dos hibridomas em cultura e concentração de anticorpos monoclonais

Os dois clones de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais utilizados nesse trabalho foram obtidos por PASTOR et al., 2017 e SILVA, 2017: são eles 1H10 e 3G8 da classe IgG1. Para cultivar os hibridomas produtores desses anticorpos foi utilizado primeiramente o meio RPMI 1640 (“Rothwell Park Memorial medium” - GIBCO), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Myoclone GIBCO), 2 mM L-Glutamine (GIBCO), 0,1mM aminoácidos não essenciais (GIBCO), além de 1 % de penicilina/estreptomicina. Posteriormente, quando as células estavam bem estabelecidas, o meio foi substituído gradativamente pelo meio hibridoma (GIBCO), suplementado com 2 mM L-Glutamine (GIBCO). As células foram mantidas em suspensão estacionária dentro de garrafas de cultura de células em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Após alguns dias, 50ml do sobrenadante das células produtoras dos dois anticorpos monoclonais foi recolhido e concentrado utilizando o concentrador Amicon® Stirred Cell 50ml (Merck Millipore). Após o volume de meio ser adicionado ao concentrador, este foi submetido a centrifugação 14.000g durante 15min. Por último o concentrado foi recolhido e armazenado à -20°C e depois submetido à separação eletroforética. Para verificar o rendimento dos anticorpos monoclonais concentrados foi feita uma divisão da concentração final dos anticorpos dividido pelo volume inicial utilizado.

5.5 Extrato proteico de *Wuchereria bancrofti*

Para fazer o extrato protéico de *W. bancrofti*, dois vermes adultos fêmeas foram ressuspensos em 100ul de tampão de amostra para SDS-PAGE, seguido de aquecimento da amostra durante 5 minutos a uma temperatura de 100° C. O processo de ressuspensão foi então repetido durante 30 segundos e a amostra submetida a vapor por mais 2 min/100°C. Para garantir a lise total do verme, o volume foi ressuspensado durante 30 segundos com subsequente aquecimento durante 1 minuto. O extrato do verme foi alíquotado e armazenado a -80°C, para posterior separação eletroforética em gel SDS-PAGE.

5.6 Eletroforese em gel SDS-PAGE

Para separar, detectar ou quantificar a expressão e purificação da proteína rWb14, os anticorpos monoclonais concentrados, anticorpos policlonais purificados, o extrato proteico

de *W. bancrofti* e o soro de pacientes positivos e não endêmicos para filariose, foi realizada a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE. Um volume de 5 µL do tampão de amostra para SDS-PAGE contendo beta-mercaptoetanol foi adicionado às amostras analisadas. Para promover a separação das mesmas, a corrida eletroforética foi realizada numa tensão de 300V, 35mA, durante 1 hora e 40min com posterior visualização das bandas devido à coloração em corante Azul de Coomassie, submetido a agitação por 20 minutos, seguido de descoloração em solução de ácido acético e metanol. A quantificação das bandas foi feita a partir da comparação com um padrão de massa utilizando a albumina sérica bovina (BSA) nas quantidades de 0,25, 0,5, 1,0, e 2,0 µg, e marcadores de peso molecular (GE Healthcare). A quantificação das proteínas foi realizada através do software *Kodak ID image analysis* (Rochester, New York, EUA), segundo a densitometria do gel.

5.7 Western blotting

Para os ensaios de *Western blotting*, foram utilizadas as seguintes amostras: rWb14 purificada, o extrato de *E. coli* sem plasmídeo, o extrato protéico de verme adulto de *W. bancrofti*, o soro de pacientes microfilarêmicos, e os soros de indivíduos negativos para FL do estado de Belo Horizonte (considerado não endêmico). As amostras foram fracionadas em gel *SDS PAGE* 20% e transferidos para membranas de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno, Immobilon-P, Millipore Corporation) em sistema de transferência semi-seco. Na primeira etapa, as membranas foram então bloqueadas em solução de leite 5% em TBS/Tween-20 (20mM Tris, 500mM NaCl, Tween 20 1% pH 7,5) por 1 hora. Posteriormente, foram incubadas durante a noite com os soros, anticorpos monoclonais concentrados ou policlonais purificados utilizando diluições variadas. Então, as membranas foram lavadas por 10 minutos, três vezes, com TBS/Tween-20 0,5%. Em seguida, uma nova incubação de 1 hora foi realizada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Jackson Immunoresearch Laboratories), anti-IgG camundongo (Sigma-Aldrich), ou anti-IgG humano, de acordo com o anticorpo primário utilizado, na diluição de 1:10.000. Decorrido esse tempo, foram novamente lavadas três vezes com TBS/Tween 20 0,5% por 10 minutos. Após as lavagens, as membranas foram incubadas durante 3 minutos em uma solução de quimiluminescência comercial (*Immobilon Forte Western HRP substrate* - Millipore), seguida de revelação em equipamento iBright CL1000 (Invitrogen).

5.8 ELISA sanduíche para detecção da rWb14

Um ELISA sanduíche foi padronizado utilizando quatro combinações diferentes de anticorpos policlonais e monoclonais tanto na captura quanto na detecção. São elas: policlonal-1H10, policlonal-3G8, 1H10-policlonal e 3G8-policlonal. Para isso, placas de poliestireno (Corning 3690, Costar, USA) foram revestidas com 100 ng/ul de anticorpos policlonais ou monoclonais diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 e incubadas durante a noite à 4°C. A placa foi lavada cinco vezes com PBS com 0,05% Tween-20 e bloqueadas com PBS com 5% leite por 2 horas. Após o bloqueio, novas lavagens foram realizadas e então os poços foram incubados com a rWb14. Para saber qual é o limite de detecção do sistema, foram utilizadas diluições da proteína desde 100ng/poço a 100 ft/poço. Foram então adicionados os anticorpos policlonais ou monoclonais, também na concentração de 100 ng/uL por poço, e a placa foi incubada por uma hora a 37°C. Um anticorpo secundário associado a peroxidase foi adicionado numa diluição de 1:15.000, seguido de adição do substrato BD OptEIA™ TMB (BD Biosciences, USA) por 15min a temperatura ambiente. Então, a reação foi interrompida com 25 µl/poço de 1N H₂SO₄ seguida da leitura das placas a 450 nm usando o espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (BIORAD, USA) e os resultados expressos em densidade óptica (OD). O branco da reação consiste em uma solução de PBS/0,5% leite, o diluente do antígeno.

5.9 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE (CEP - 45085215.0.0000.5190).

5.10 Detecção de antígeno filarial circulante Wb14 nos soros dos pacientes

O antígeno filarial circulante em soro clínico foi analisado através do ELISA sanduíche. Foram utilizados 25 soros de pacientes do banco de amostras biológicas do SRNF/Fiocruz-PE (CEP - 45085215.0.0000.5190) (ROCHA et al., 2009). Elas foram selecionadas de acordo com avaliação clínica e parasitológica, e então divididas em cinco grupos, como segue: MF - indivíduos microfilarêmicos (positivos para FL) (n=5); NEN- não endêmicos normais (indivíduos normais de regiões não endêmicas, os soros utilizados nos experimentos foram de pacientes da cidade de Belo Horizonte) (n=5); ST - indivíduos *Strongyloides* positivos (n=5) além de outros parasitas intestinais; PatCr – indivíduos com patologia crônica (n=5); EN - endêmicos normais (indivíduos normais de regiões endêmicas)

(n=5). As análises desses soros foram realizadas pelo serviço de referência em FL do Aggeu Magalhães, através da pesquisa de microfilárias pela técnica de filtração em membrana de polycarbonato, pesquisa de antígenos nos testes POC-ICT e ELISA Og4C3, e pesquisa de anticorpos com teste Bm14. O ELISA realizado nessa etapa do projeto diferiu apenas na amostra a ser testada, ou seja, após o bloqueio com PBS/5% leite, ao invés da rWb14 em variadas diluições, os poços foram incubados com soros humanos na diluição 1:10 (em PBS/0,05% leite), durante 1 h seguido de incubação com anticorpos durante 1h a 37°C, e processados como descrito anteriormente. As reações foram reveladas e a leitura realizada no espectrofotômetro à 450 nm no leitor de microplaca Benchmark Plus (BIORAD, USA). O grupo MF é composto por amostras consideradas verdadeiros positivos, enquanto o NEN é composto pelos verdadeiros negativos. O grupo ST pretende verificar a possibilidade de reação cruzada com *Strongyloides* e o PatCr foi utilizado para verificar a manutenção do antígeno no soro dos pacientes crônicos. Por fim, o grupo EN visa verificar se o ELISA reconhece soro de moradores da Região Metropolitana do Recife que não estão infectados.

5.11 Análises estatísticas

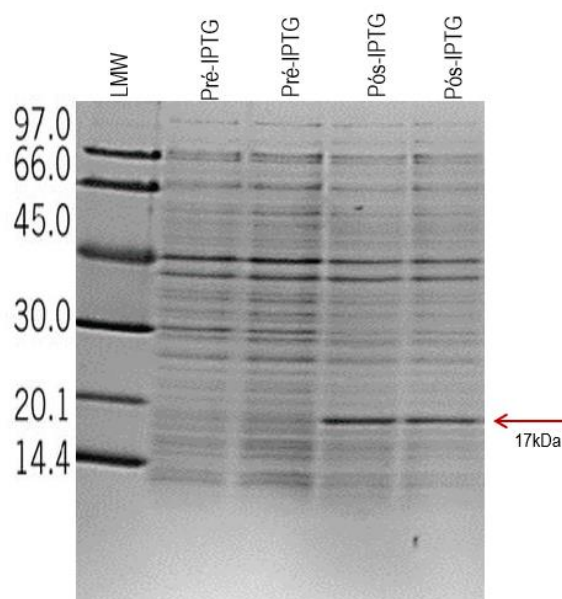
Todos os gráficos foram produzidos usando o programa *GraphPad prism software*, version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores médios de OD para cada amostra foram utilizados para calcular a resposta do antígeno Wb14, sendo o *cut off* a média da OD do grupo NEN mais três vezes o desvio padrão da média desse mesmo grupo.

6. RESULTADOS

6.1 Expressão da proteína rWb14

No presente trabalho a rWb14 foi expressa em *E. coli* BL21 com um marcador de polihistidina N-terminal, seguido de execução em gel SDS-PAGE para monitorar a integridade da proteína. Como pode ser visto na figura 7, a proteína rWb14 foi visualizada com o tamanho esperado de 17kDa apenas nos poços referentes no extrato bacteriano submetido a indução da expressão por IPTG. Os poços referentes à mesma cultura de bactérias antes do IPTG ser adicionado, não apresentaram a proteína de interesse.

Figura 7: Expressão em larga escala da proteína rWb14 fusionada a histidina.



Fonte: A autora.

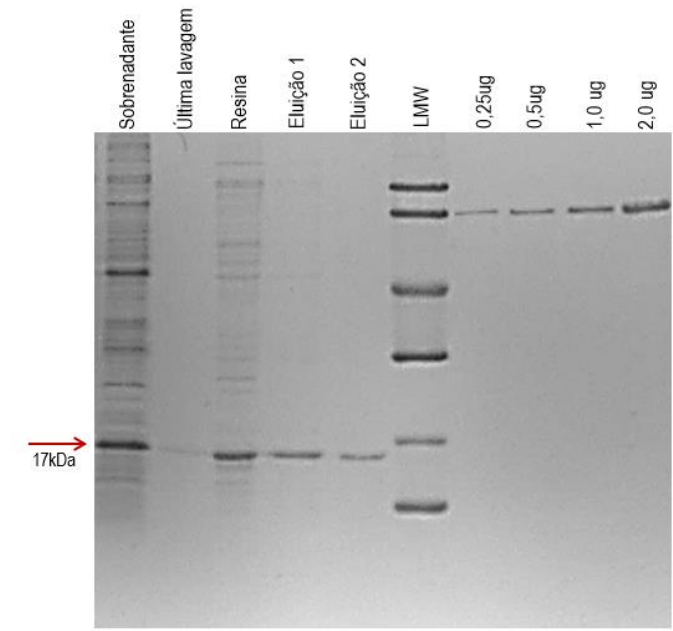
Legenda: Gel de SDS-PAGE 20% corado com Azul de Coomassie. Esse experimento foi realizado em duplicata. Os poços pré-IPTG significam que ainda não está ocorrendo a expressão da proteína rWb14, enquanto que no pós-IPTG pode-se notar a proteína expressa na altura da seta. Os pesos moleculares estão expressos em kilodaltons (kDa) à esquerda. Marcador: LMW (Low molecular weight) GE Healthcare

6.2 Purificação da rWb14 por IMAC

A purificação da rWb14 foi feita imediatamente após a indução em larga escala, através da técnica de cromatografia de afinidade por metal iônico (IMAC), seguido de resolução em SDS-PAGE. A rWb14 de aproximadamente 17 kDa aparece bem purificada sem sinal de degradação na altura da seta com quantificação aproximada de 200ng/ul na eluição 1, e 100 ng/ul na eluição 2 (figura 9), utilizando concentrações de BSA conhecidas como padrão de massa molecular. Problemas foram encontrados na eluição, pois fica claro que uma

quantidade importante de proteína ficou retida na resina, bem como foi perdida no sobrenadante descartado. Para experimentos posteriores, é recomendável que a quantidade de imidazol seja aumentada no tampão de eluição.

Figura 8: Purificação da proteína rWb14.



Fonte: A autora.

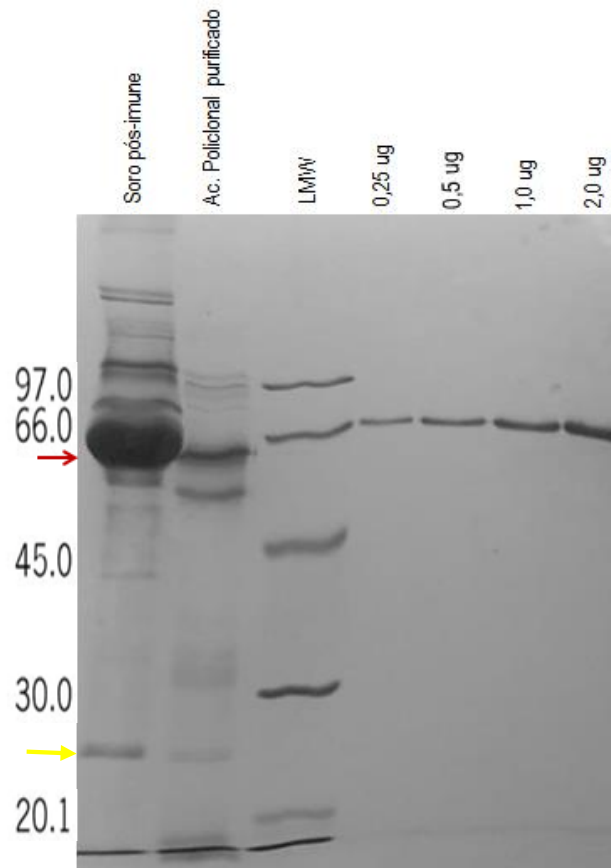
Legenda: Gel de SDS-PAGE 20% corado com Comassie Blue. A quantidade de proteína obtida foi quantificada a partir da curva de BSA de concentrações conhecidas. O sobrenadante é o meio contendo todas as proteínas, última lavagem da resina acoplada à proteína, resina de níquel que tem afinidade à cauda de histidina da proteína, e eluição 1 e 2 são as proteínas já purificadas. O marcador de peso molecular utilizado foi o LMW GE Healthcare. Do lado direito da foto estão descritas as concentrações de BSA utilizadas como referências para a quantificação.

6.3 Purificação dos anticorpos policlonais contra rWb14

A proteína rWb14 pura foi utilizada no processo de purificação dos anticorpos policlonais, que logo após foram submetidos a corrida eletrofóretica para então serem usados na validação do ELISA sanduíche. Um comparativo entre o soro pré-imune do coelho com o anticorpo policlonal foi feito no gel, no qual fica clara uma purificação eficiente, com menos bandas inespecíficas. Os anticorpos da classe IgG são compostos por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, essas características podem ser notadas na altura da seta vermelha onde aparecem as cadeias pesadas em torno de 65kDa, enquanto que as cadeias leves possuem cerca de 25kDa na altura da seta amarela (Figura 10). Levando em consideração a curva de BSA, através da intensidade da banda referente aos anticorpos, a quantificação resultou em 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, num volume final de 150 μL . Então, a partir de 1 ml do soro pós-imune foi

possível purificar 60 μ g de anticorpos policlonais anti-rWb14, com rendimento em torno de 0,06 μ g/ μ L.

Figura 9: Purificação dos anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a proteína Wb14.



Fonte: A autora.

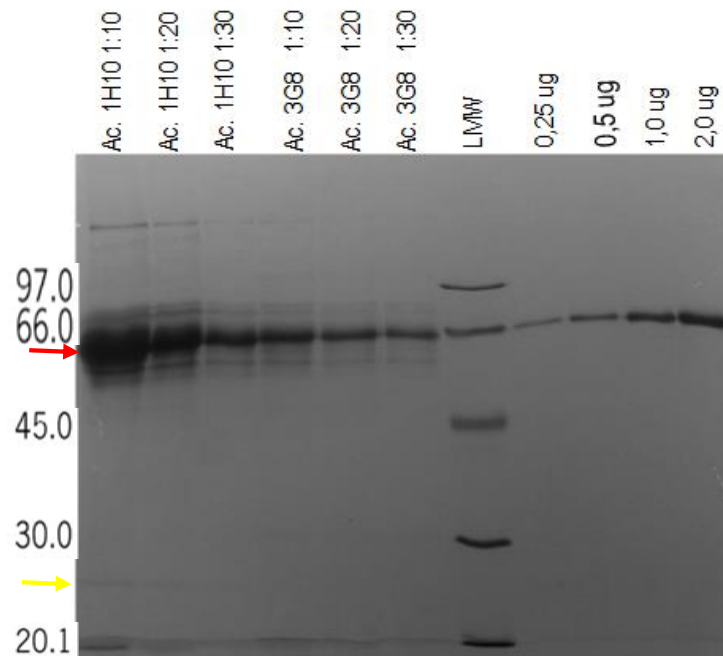
Legenda: Gel de SDS-PAGE 20% corado com Azul de Comassie. A quantidade de anticorpo obtida foi quantificada a partir dessa curva de BSA de concentrações conhecidas. A seta vermelha indica a altura da cadeia pesada do anticorpo policlinal, e a seta amarela indica a altura da cadeia leve do anticorpo. O marcador de peso molecular utilizado foi o LMW (GE Healthcare). Do lado direito da foto estão descritas as concentrações de BSA utilizadas como referências para a quantificação.

6.4 Concentração dos anticorpos monoclonais contra rWb14

Os sobrenadantes das culturas dos hibridomas produtores dos anticorpos 1H10 e 3G8 foram recolhidos e concentrados para serem usados na padronização do ELISA sanduíche. A figura 11 mostra o padrão de bandas dos dois anticorpos monoclonais, que foram utilizados nas diluições 1:10, 1:20 e 1:30, com o intuito de facilitar a quantificação. Assim como os anticorpos policlonais, os monoclonais são compostos por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, as cadeias pesadas também aparecem com tamanho em torno de 65kDa (seta vermelha), enquanto que as cadeias leves possuem aproximadamente 25kDa (seta amarela) (Figura 11). O 1H10 atingiu uma quantificação final de 6 μ g/ μ l, enquanto o 3G8 apresentou 2

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$, num volume final de 1,5 ml. A partir de 12 ml de sobrenadante de cultura, foi possível concentrar 9 mg de anticorpo 1H10 e 3 mg de anticorpo 3G8, com eficiência de $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e a $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para cada um, respectivamente.

Figura 10: Anticorpos monoclonais anti-rWb14 1H10 e 3G8 purificados.



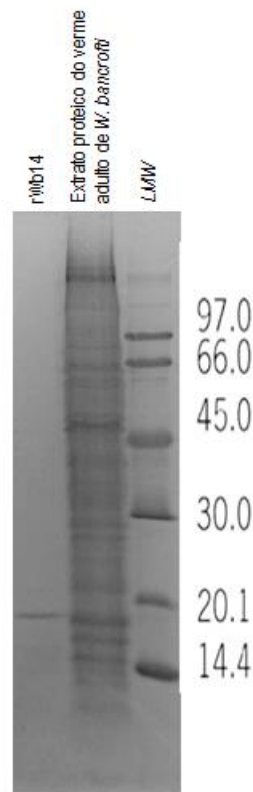
Fonte: A autora.

Legenda: Gel de SDS-PAGE 20% corado com Azul de Comassie. A quantidade de proteína obtida foi quantificada a partir dessa curva de BSA de concentrações conhecidas. A seta indica o anticorpo purificado. Marcador de peso molecular: LMW (GE Healthcare).

6.5 Produção do extrato proteico de *Wuchereria bancrofti*.

Um passo importante nesse trabalho foi conseguir produzir o extrato proteico do verme adulto de *W. bancrofti*, pois este é o primeiro relato na literatura. Até o momento, outros trabalhos relataram a produção de extrato proteico apenas de microfilárias. Para comprovação da integridade das proteínas presentes na mistura, uma alíquota de 10 μl foi submetida a uma corrente constante para separação das proteínas em gel de poliacrilamida, usando sempre como controle positivo a rWb14.

Figura 11: Extrato proteico do verme adulto de *Wuchereria bancrofti*.



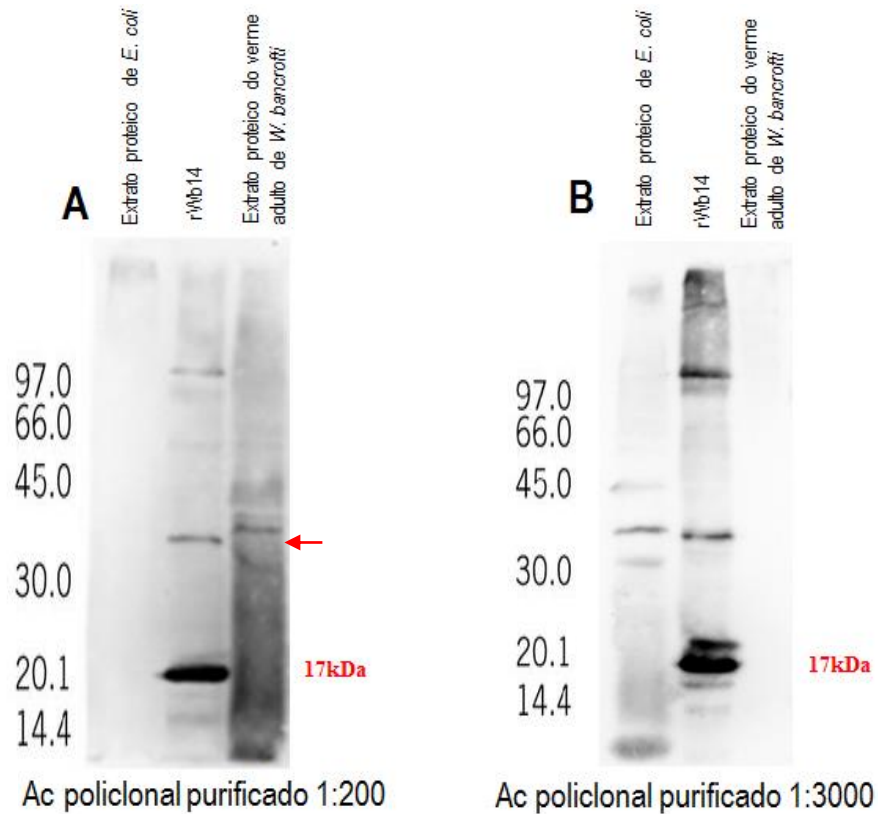
Fonte: A autora.

Legenda: Gel de SDS-PAGE 20% corado com Azul de Comassie. A seta vermelha do lado direito indica a rWb14. Marcador de peso molecular: LMW (GE Healthcare).

6.6 Detecção da rWb14 e da Wb14 no extrato proteico do verme adulto de *W. bancrofti* pelos anticorpos policlonais

Primeiramente, os anticorpos policlonais purificados foram testados quanto à capacidade de detectar o antígeno rWb14 bem como sua forma nativa presente no extrato proteico de verme adulto de *W. bancrofti*. Para isso foi feito um *western blotting* com as diluições 1:200 e 1:3000 do anticorpo policlonal. O controle negativo utilizado foi novamente o extrato de *E. coli* sem plasmídeo, e a rWb14 como controle positivo. Na figura 13 A e B abaixo pode-se perceber que o resultado esperado não foi obtido, visto que apesar dos anticorpos serem bastante específicos para Wb14 e identificarem muito bem essa proteína no seu estado recombinante, eles não reconheceram a Wb14 nativa no extrato do verme adulto. Entretanto uma banda de aproximadamente 30kDa foi detectada na diluição 1:200, podendo ser alvo de investigações posteriores em gel bidimensional (Figura 13A).

Figura 12: Western blot utilizando anticorpos policlonais para a detecção da rWb14 e da sua forma nativa no extrato proteico de *W. bancrofti*.

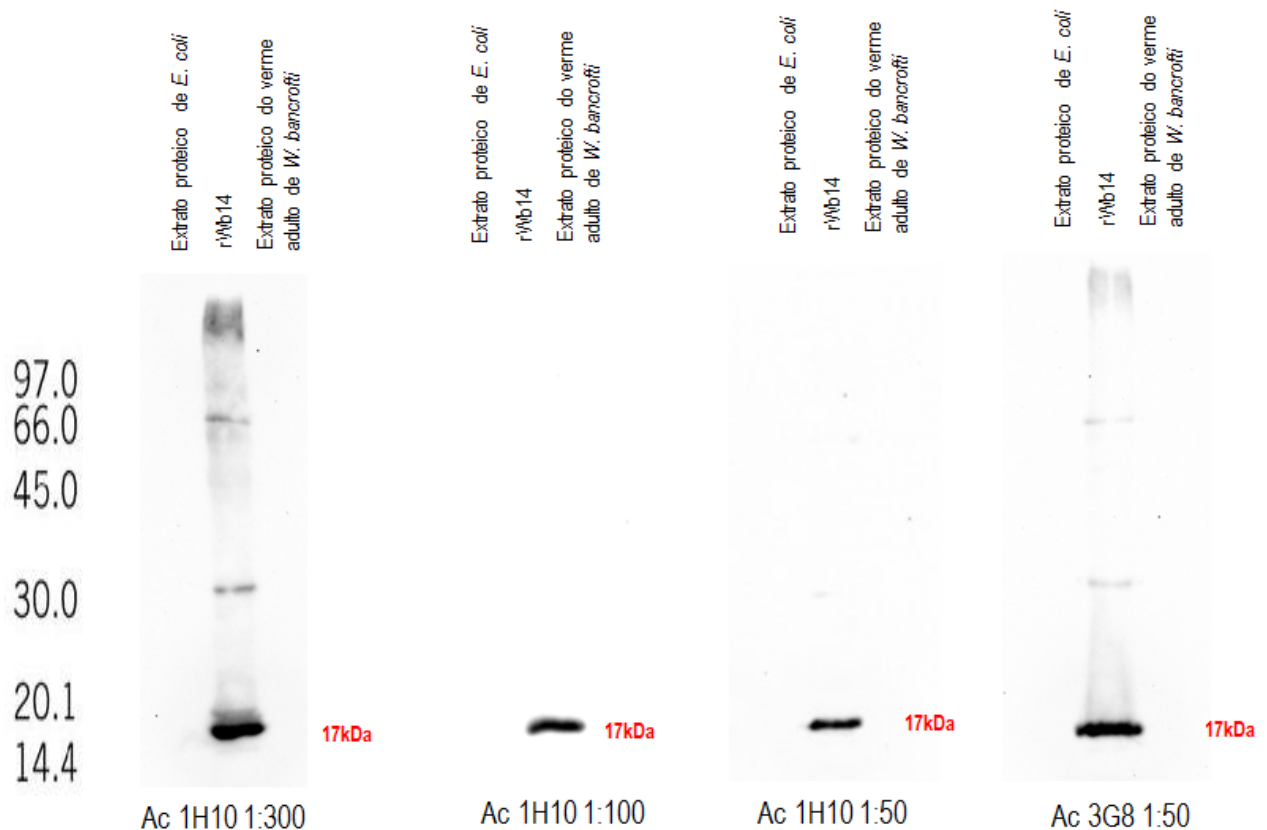


Fonte: A autora.

Legenda: As amostras utilizadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e analisadas por Western blot contra os anticorpos policlonais anti-rWb14, na concentração de 1:200 e 1:3000. Os tamanhos do marcador de peso molecular [LMW (GE Healthcare)] estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

O anticorpo monoclonal 1H10 diluído 1:50, 1:100 e 1:300, e 3G8 na diluição 1:50, também foi testado quanto ao seu reconhecimento diante do antígeno recombinante e nativo. Ao contrário do anticorpo policlonal que reconheceu uma banda de 30kDa (Figura 13A), neste ambos monoclonais não apresentaram nenhuma detecção da Wb14 no extrato do verme adulto, sendo reconhecida apenas a rWb14 em todas as diluições testadas (Figura 14).

Figura 13: Western blot utilizando os anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 para a detecção da rWb14 e da sua forma nativa no extrato proteico de *W. bancrofti*.



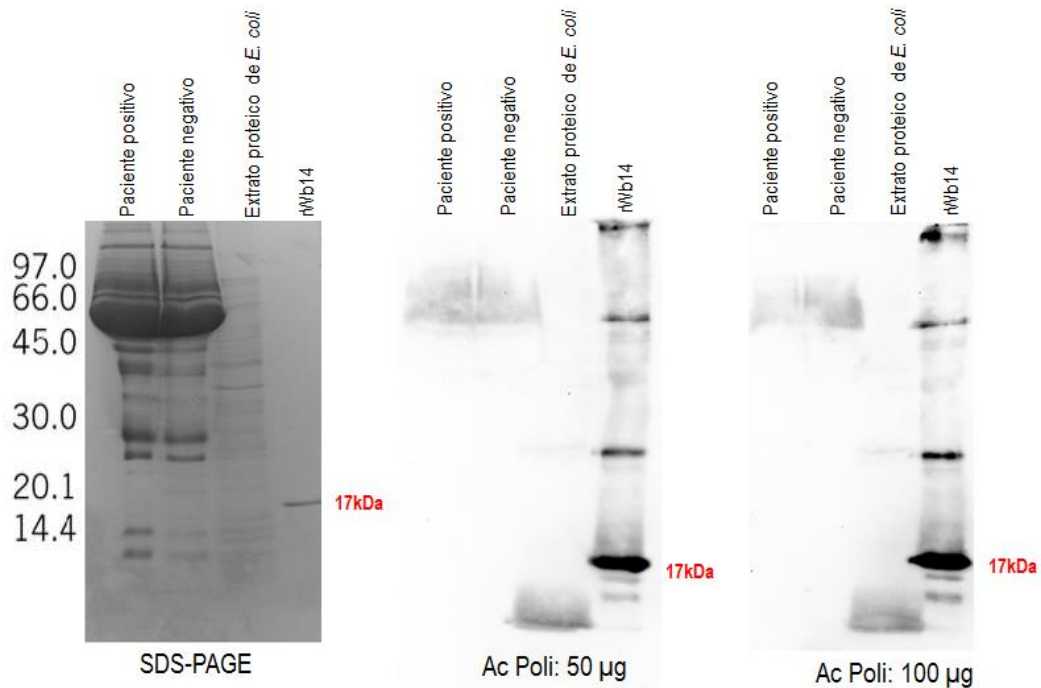
Fonte: A autora.

Legenda: As amostras utilizadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e analisadas por Western blot contra os anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 anti-rWb14, na concentração de 1:50, 1:100 e 1:300. Os tamanhos do marcador de peso molecular [LMW (GE Healthcare)] estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

6.7 Detecção da Wb14 nativa no soro de paciente microfilarêmico pelos anticorpos anti-rWb14

O próximo passo do nosso trabalho foi verificar se tanto os anticorpos policlonais quanto monoclonais tinham êxito no reconhecimento do antígeno nativo Wb14 circulante no soro de pacientes microfilarêmicos. Então para isso, o soro de um paciente microfilarêmico e um soro de paciente negativo (Habitante de uma região não endêmica para FL) foi separado em SDS-PAGE e transferido para membrana de PVDF. O anticorpo policlonal foi primeiramente testado, com uma quantidade de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Apesar da alta quantidade de anticorpo utilizada, resultados positivos no reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos não foram obtidos, pois nenhuma banda foi observada nos poços referentes ao soro do paciente microfilarêmico (Figura 15).

Figura 14: Eficácia dos anticorpos policlonais frente ao antígeno Wb14 nativo no soro de paciente.

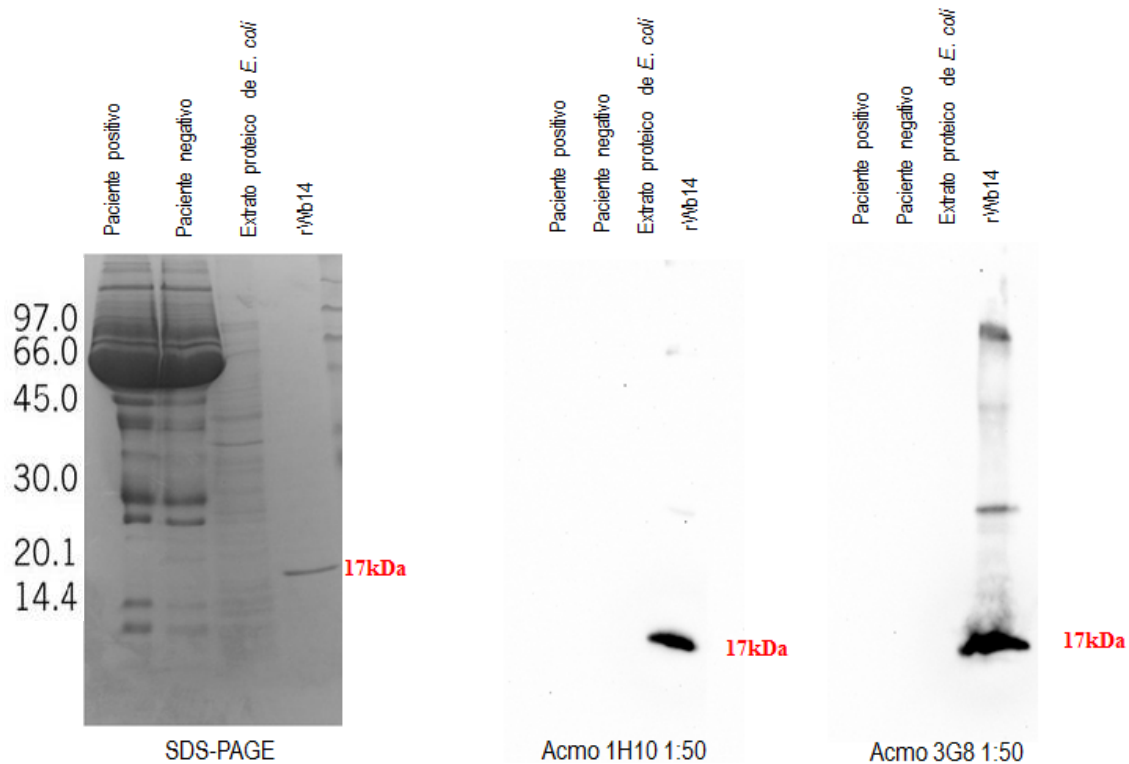


Fonte: A autora.

Legenda: As amostras utilizadas foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e analisadas por Western blot contra os anticorpos policlonais anti-rWb14, na concentração de 50 µg/µl e 100 µg/µl. Paciente positivo: Microfilarêmicos; Paciente negativo: Não endêmico; Extrato de *E. coli*: controle negativo; rWb14: controle. Os tamanhos do marcador de peso molecular [LMW (GE Healthcare)] estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

No caso dos anticorpos monoclonais, foi utilizada a menor diluição 1:50, entretanto também não foi observado no extrato do verme nenhum reconhecimento, apenas a proteína rWb14 nos dois anticorpos testados (Figura 16).

Figura 15: Eficácia dos anticorpos monoclonais frente ao antígeno Wb14 nativo no soro de paciente.



Fonte: A autora.

Legenda: As amostras utilizadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e analisadas por Western blot contra os anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 anti-rWb14 na diluição 1:50. Paciente positivo: Microfilarêmicos; Paciente negativo: Não endêmico; Extrato de *E. coli*: controle negativo; rWb14: controle positivo. Os tamanhos do marcador de peso molecular [LMW (GE Healthcare)] estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

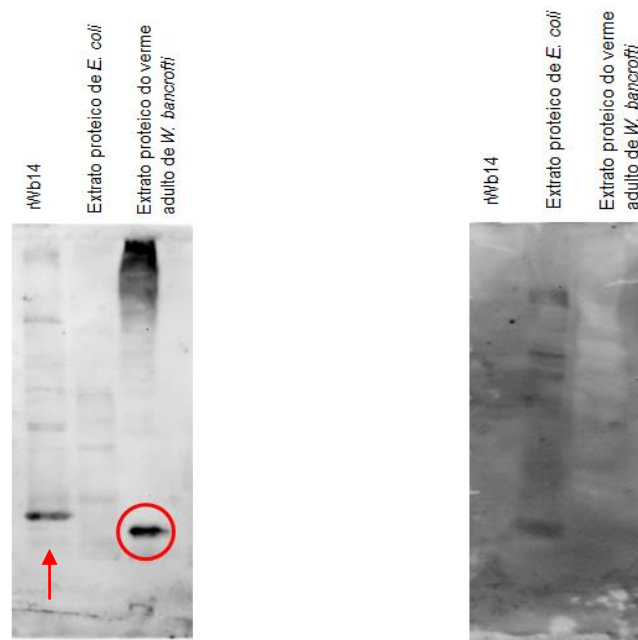
6.8 Reconhecimento da rWb14 e da Wb14 nativa no extrato proteico de *W. bancrofti* pelos anticorpos do soro de pacientes microfilarêmicos

A fim de verificar se os anticorpos circulantes no soro de pacientes microfilarêmicos reconheciam efetivamente a proteína Wb14 nativa no extrato proteico do verme adulto, foi feito um *western blotting*. As proteínas do extrato foram novamente separadas em gel de poliacrilamida e a proteína recombinante foi utilizada novamente como controle positivo. Um pool de soros de pacientes microfilarêmicos com alta titulação de anticorpos, bem como positivos em todas as técnicas de diagnóstico para FL, foi utilizado como anticorpo primário numa diluição de 1:2.000. Como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG total humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories) na diluição 1:10.000. Na figura 17A pode-se perceber que os anticorpos contidos no soro dos pacientes conseguem detectar a rWb14, porém não há indícios da mesma quando observamos o poço referente ao extrato de verme

adulto da *W. bancrofti*. No entanto, imediatamente abaixo da banda de 17kDa aparece no extrato uma banda de aproximadamente 14 kDa, aparentando ser importante na infecção desses pacientes visto o forte reconhecimento dos anticorpos pela mesma.

Também foi feito um teste utilizando amostras com as mesmas condições citadas imediatamente acima, utilizando agora um pool de soros de pacientes não endêmicos, também com diluição 1:2000, a fim de comprovar o resultado obtido acima (figura 17B). Como pode-se observar na figura abaixo, não houve reconhecimento da proteína rWb14, bem como da sua forma nativa no extrato de *W. bancrofti*.

Figura 16: Western blot do extrato de *W. bancrofti* com pool de soros de pacientes MF e NE.



Fonte: A autora.

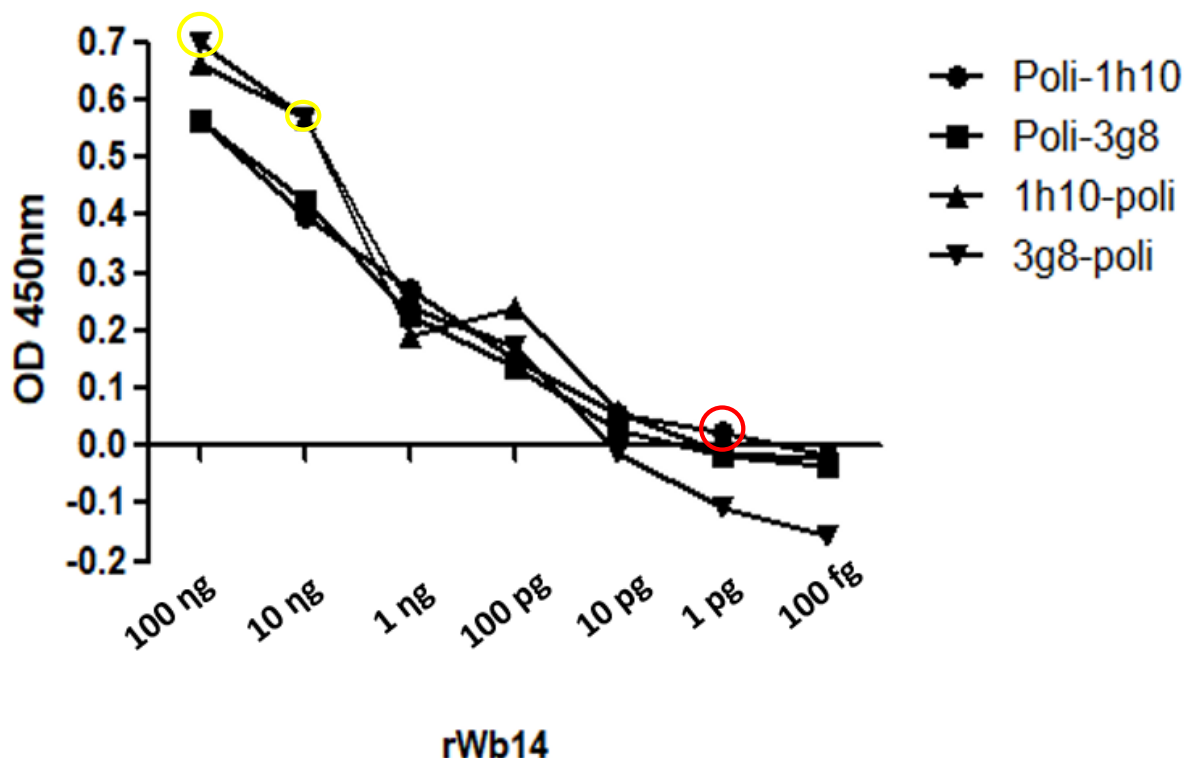
Legenda: As amostras utilizadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e analisadas por Western blot contra os anticorpos contidos no soro de paciente positivo para FL (painel à esquerda) e no soro negativo (painel à direita), na diluição de 1:2000. A seta indica a proteína rWb14 reconhecida pelo soro microfilarêmico. Os tamanhos do marcador de peso molecular [LMW (GE Healthcare)] estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

6.9 Curva de detecção do antígeno rWb14

Um ELISA sanduíche foi feito com várias concentrações da rWb14 para avaliar a sensibilidade dos anticorpos monoclonais concentrados e policlonais purificados obtidos. Para tal, os anticorpos foram testados em quatro combinações: primeiramente policlonal como anticorpo de captura e os monoclonais na detecção (Poli-Ag-1H10 e Poli-Ag-3G8) e depois o contrário (1H10-Ag-Poli e 3G8-Ag-Poli). Os resultados mostraram que quando o monoclonal

3G8 foi usado como captura em conjunto com o policlonal na detecção (3g8-Ag-Poli) apresentou maiores valores de densidade óptica nas maiores concentrações, revelando OD's de 0,7 e 0,6 nas concentrações 100ng e 10 ng (sinalizado em amarelo na figura 18). O outro monoclonal, 1H10, revelou valores semelhantes ao anterior, quando utilizado nos mesmos padrões. Quanto a proposta dos anticorpos policlonais na captura e monoclonais na detecção, ambos conjuntos (Poli-Ag-1H10 e Poli-Ag-3G8) revelaram OD's positivas até a diluição de 10 pg, sendo que o Poli-Ag-1H10 manteve-se positivo até 1 pg da rWb14, sendo assim a combinação com a maior sensibilidade de todas (sinalizado em vermelho na figura 18).

Figura 17: Quatro combinações dos anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 e policlonais em ensaios de ELISA sanduíche anti-rWb14.



Fonte: A autora.

Legenda: Os poços da placa de ELISA foram revestidos com 100ng de anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 ou 100 ng de policlonais diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M, pH 9,6 seguido por incubação com proteína rWb14 em concentração variável (100 ng a 100 fg). A ligação dos antígenos foi detectada por anticorpos secundários Anti-IgG de camundongo ou coelho ligados a peroxidase. O ensaio foi detectado utilizando o substrato - TMB.

6.10 ELISA sanduíche para a detecção de antígeno nativo Wb14 circulante nos soros dos pacientes.

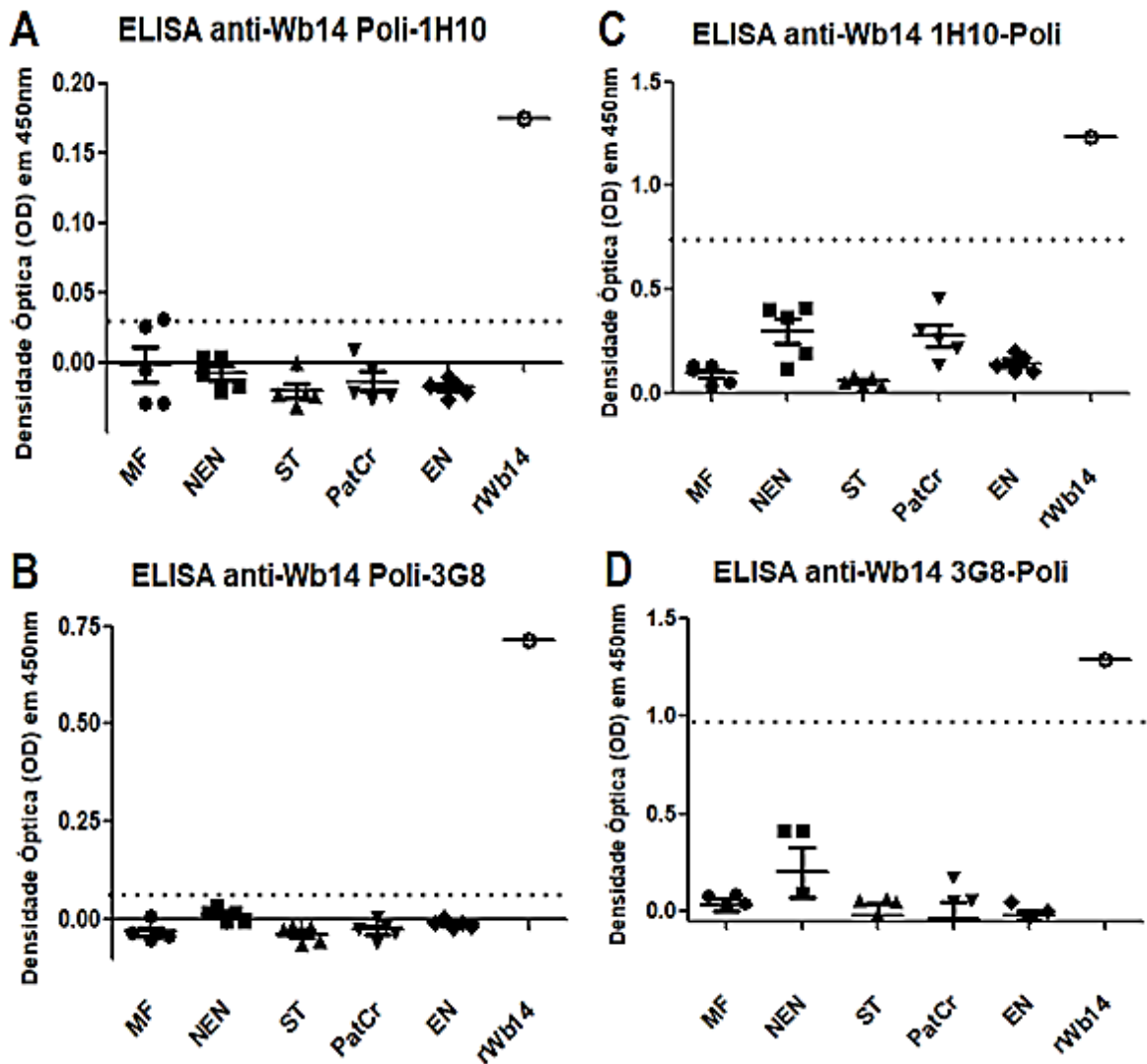
Para detectar a presença do antígeno nativo do verme circulante no soro dos pacientes, foram testados os quatro tipos de ELISA sanduíche anteriormente padronizados. Pode ser

observado abaixo que o sistema Poli-1H10 (Figura 19A) apresentou melhor detecção diante das quatro possibilidades, em concordância com o resultado apresentado imediatamente acima (único conjunto que reconheceu a proteína na concentração de 1 pg). Percebe-se que dois dos cinco pacientes microfilarêmicos foram positivos no teste, apesar de estarem perto da linha do *cut off* (o número mínimo para as amostras serem consideradas positivas) (Figura 19A). Devido a isso, esse sistema se sobressai quando comparado aos outros apresentados, podendo ser explorado mais adiante com um número maior de amostras do SRNF/FIOCRUZ-PE. O conjunto Poli-3G8 não apresentou resultados promissores visto que nenhum paciente dos cinco grupos apresentou algum tipo de reconhecimento (Figura 18B).

O próximo passo consistiu em utilizar os anticorpos monoclonais 1H10 e 3G8 na detecção, e os policlonais como captura. Ao analisar a figura abaixo (Figura 19 C/D), fica clara a inexistência de reconhecimento da proteína nativa Wb14 nos pacientes dos cinco grupos testados, apenas o controle positivo (rWb14). Nos gráficos C e D, percebe-se que os pacientes não endêmicos apresentaram valores de densidade ótica mais elevados do que os indivíduos microfilarêmicos, isso pode ter acontecido por que os soros que foram utilizados estavam hemolizados, hipoteticamente isso pode ter levado a detecção inespecífica nesses soros. Para confirmar essa hipótese, testes com soros sem hemólise de indivíduos não endêmicos deverão ser feitos, acoplado a ajustes na metodologia como aumento da concentração do bloqueio.

Para avaliar reação cruzada no teste foram utilizados soros de indivíduos *Strongyloides* positivos, nota-se nos gráficos abaixo que não houve positividade em nenhuma das possibilidades.

Figura 18: ELISA sanduíche anti-Wb14 com banco de amostras biológicas do SRNF/Fiocruz-PE.



Fonte: A autora.

Legenda: O *cut off* é o ponto em que as amostras são consideradas positivas. No eixo X estão localizados os cinco grupos de soros utilizados: MF: Pacientes microfilarêmicos; NEN: Não-endêmicos; ST: Strongyloides positivos; PatCr: Indivíduos com patologia crônica; EN: Indivíduos endêmicos normais; rWb14: Wb14 recombinante.

7. DISCUSSÃO

Nos países que são endêmicos para FL, ela é considerada a segunda doença mais transmitida por vetor. Essa doença, que carrega consigo impacto de cunho social e econômico, provoca a desfiguração dos membros dos indivíduos acometidos além de levar ao comprometimento físico a longo prazo. Diagnósticos sensíveis e de baixo custo na detecção da FL e no monitoramento da população infectada são essenciais para uma vigilância eficaz e detecção precoce para contribuir com a erradicação da doença, como preconiza a OMS (RAVISHANKARAN et al., 2015, WHO, 2010). Anticorpos policlonais e monoclonais anti-rWb14 foram avaliados neste trabalho para serem utilizados no desenvolvimento de um ELISA de captura de antígenos. A melhor combinação encontrada foi aquela que usou o anticorpo policlonal anti-rWb14 como captura e o monoclonal 1H10 anti-rWb14 como detecção. Esse sistema foi capaz de reconhecer 1pg da rWb14 e 2/5 pacientes microfilarêmicos.

O diagnóstico imunológico da FL surgiu para resolver problemas dos métodos parasitológicos como a limitação no horário da coleta de sangue e melhora da sensibilidade. Os primeiros testes de captura de antígenos foram desenvolvidos com anticorpos monoclonais produzidos a partir de extratos proteicos de vermes, como o Og4C3 (MORE & COPEMAN, 1990) e o ICT (WEIL et al., 1997). Porém, com o avanço da biologia molecular os antígenos recombinantes surgiram como uma alternativa para o desenvolvimento de diagnósticos sensíveis para a FL, visando resolver problemas que existiam na produção do extrato, além da reação cruzada com outros vermes. Dentre os que já foram utilizados, destacam-se o BmSXP-1 (LALITHA, 2002; RAHUMATULLAH et al., 2015; OMAR et al., 2018), WbSXP-1 (LALITHA, 2002; PANDEY et al., 2011; VISHAL et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016), BmVAH (RAVISHANKARAN et al., 2016) e BmALT-2 (RAVISHANKARAN et al., 2014).

Apesar desses avanços, ainda existem problemas que devem ser resolvidos nos testes de captura de antígenos como a presença de uma antigenemia positiva prolongada, aparecendo mesmo após expressivos tratamentos antifilarioses. Isso leva a dificuldades na identificação de pacientes com infecção ativa daqueles com infecção passada e de indivíduos não infectados, porém expostos às larvas infectantes. Diante disto, a aplicação desses testes nos serviços de monitoramento e controle da FL se torna limitada, não sendo útil para avaliar o critério de

cura de pacientes filarêmico (FREEDMAN et al., 2001; SCHUETZ et al., 2000; WEIL; RAMZY, 2007).

Diante do que foi citado anteriormente, no presente trabalho a proteína recombinante utilizada foi a Wb14, uma forma naturalmente truncada da WbSXP-1 por apresentar um códon de parada na posição do nucleotídeo 460 do gene (PANDIARAJA et al., 2010). A WbSXP-1 tem sido utilizada em vários trabalhos que visam produzir diagnósticos para FL, mas a Wb14 ainda não tinha sido utilizada para o desenvolvimento de um teste para captura de antígeno (LALITHA et al., 2002; JARNADHAN et al., 2010; RAVISHANKARAN et al., 2015; RAVISHANKARAN et al., 2016). Ambas pertencem a uma família de proteínas de vermes nematóides identificada como imunógenos potentes frente a infecções parasitárias (RAO et al., 2000). Além disso, foi relatado que a WbSXP-1 difere da Wb14 por uma região de 29 aminoácidos no C' terminal que possui homologia com muitos patógenos, incluindo algumas espécies de *Plasmodium* e *Leishmania infantum*, o que poderia aumentar a reatividade cruzada (PANDIARAJA et al., 2010). No entanto, como nossos anticorpos foram produzidos contra a Wb14 esse problema poderia ser resolvido.

Um trabalho precursor realizado pelo nosso grupo testou a Wb14 como alvo para um teste de captura de anticorpos e observou que o ELISA anti-rWb14 apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes utilizados no PGEFL (Og4C3 e POC-ICT), além de melhor especificidade do que o ELISA Bm14 (kit comercial de captura de anticorpos). Entretanto, para indivíduos *Strongiloides* positivos houve reação cruzada, semelhante ao Bm14. Além disso, o ELISA anti-rWb14 ainda não foi avaliado quanto ao reconhecimento em outros organismos filarídeos, como *B. malayi* e *B. timori* e reação cruzada para *O. volvulus* e *Loa loa*. Apesar da reação cruzada com *Strongiloides*, os resultados promissores de sensibilidade estimularam a exploração do potencial dessa proteína no desenvolvimento de um teste de captura de antígenos (PASTOR et al., 2018).

Quanto aos outros antígenos já utilizados até hoje, o BmSXP-1 foi alvo para a produção de anticorpos policlonais que mostraram ser eficientes na detecção de antígenos circulantes nos soros de indivíduos microfilarêmicos. Estes reconheceram 30/34 infectados com *W. bancrofti* e 25/30 parasitados com *B. malayi* (LALITHA et al., 2002). Quando esse ELISA foi testado com outros grupo de soros, observou-se que nos infectados com *B. malayi* 2/22 pacientes crônicos e 1/10 endêmicos normais foram positivos. Quando os infectados com

W. bancrofti foram testados, 7/31 pacientes crônicos e 6/33 endêmicos normais foram reconhecidos. Nenhuma amostra de indivíduos não endêmicos e com outros parasitas foi considerada positiva (LALITHA, 2002). Esses resultados mostraram maior sensibilidade para *W. bancrofti* e maior especificidade para *B. malayi*. No presente trabalho, os anticorpos monoclonais e policlonais apresentaram reconhecimento efetivo pela proteína recombinante Wb14, porém apenas dois de cinco dos soros microfilarêmicos foram positivos na melhor combinação. Para alcançar resultados mais robustos o número de amostras será expandido em análises posteriores, além de adequações no protocolo do ELISA.

Pesquisadores com intenção de melhorar a eficácia dos anticorpos monoclonais feitos contra a BmSXP, utilizaram a técnica de *Phage Display* (RAHUMATULLAH et al., 2015; OMAR et al., 2018). O primeiro gerou uma biblioteca de scFv utilizando sangue de pacientes com FL, que resultou em seis anticorpos monoclonais. Um dos clones foi utilizado num ELISA sanduíche e apresentou positividade em 34/34 dos pacientes com microfilaremia bancroftiana (RAHUMATULLAH et al., 2015). O outro trabalho selecionou e elaborou oito clones de anticorpos Fab capazes de se ligar ao BmSXP-1 com uma biblioteca de sangue de Chineses, Indianos e Malasianos (OMAR et al., 2018). O uso dessa técnica pode ser uma saída no desenvolvimento de novos anticorpos contra a rWb14. No entanto, para os anticorpos desenvolvidos aqui podem ser utilizadas outras metodologias para aumentar a especificidade e sensibilidade, como a purificação através de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dos anticorpos policlonais.

O antígeno análogo ao BmSXP, o WbSXP-1, também foi utilizado para desenvolver anticorpos para o diagnóstico de captura de antígenos. Neste estudo, um ELISA feito com anticorpos policlonais reconheceu 95% dos microfilarêmicos bancroftianos, 10% dos indivíduos com patologia crônica e 3% dos endêmicos normais foram positivos. Quanto aos pacientes com infecção brugiana, 80% dos microfilarêmicos foram positivos e nenhum paciente com patologia crônica e endêmico normal foram reconhecidos (LALITHA, 2002). Mais adiante, em um estudo feito por Pandey et al., 2011, os resultados do ELISA apresentaram positividade em 100% dos microfilarêmicos bancroftianos e 14% dos endêmicos normais, enquanto os indivíduos com patologia crônica e não endêmicos não foram reativos. Isso foi possível devido a associação de anticorpos monoclonais na captura do antígeno com um policlonal na detecção. No ELISA feito aqui foram reconhecidos 2

pacientes de 5 testados na melhor combinação, no entanto, para verificação mais eficaz da dessa proposta, um maior número de soros deverá ser contemplado.

No trabalho de Pandey et al., 2011 e Vishal et al., 2014, a proteína recombinante WbSXP-1 foi exposta no *western blot* aos quatro grupos de soros clínicos: microfilarêmicos, endêmicos normais, patologia crônica e não endêmicos. Destes, ela foi identificada apenas pelos pacientes verdadeiros positivos (MF), em ambos os trabalhos. Já o antígeno nativo existente no extrato de microfilária foi reconhecido pelos soros microfilarêmicos e pelos anticorpos monoclonais (PANDEY et al., 2011). Com relação a Wb14 recombinante, esta foi detectada pelos anticorpos policlonais, monoclonais e um conjunto de soros de pacientes microfilarêmicos. No entanto, o antígeno nativo Wb14 no verme adulto não foi reconhecido nem pelos anticorpos monoclonais e policlonais anti-rWb14 nem pelos soros microfilarêmicos, uma hipótese para esse resultado pode ser a lise ineficaz do extrato proteico. Os testes feitos com os anticorpos contidos no soro dos microfilarêmicos reconheceram uma banda de 14kDa no extrato de *W. bancrofti*, sinalizando que as proteínas contidas nessa banda possam estar envolvidas no desenvolvimento da FL. Somado a isso, os anticorpos policlonais anti-rWb14 detectaram uma banda de 30 kDa, que pode ser relacionada a WbSXP-1 ou Wb14 em uma forma diferente, como um dímero, por exemplo.

Anticorpos monoclonais e policlonais também foram produzidos contra os antígenos BmVAH e BmALT-2 de *B. malayi* (RAVISHANKARAN et al., 2016; RAVISHANKARAN et al., 2014). No primeiro, o ELISA sanduíche apresentou um reconhecimento de 98% de microfilarêmicos bancroftianos e 100% para microfilarêmicos brugianos. Porém, quando o ELISA-VAH foi associado ao ELISA-WbSXP-1, o chamado ELISA VS, 100% dos pacientes testados de ambas as infecções foram positivos (RAVISHANKARAN et al., 2014). Os anticorpos anti-rWb14 produzidos aqui também podem ser testados em conjunto com anticorpos diferentes visando melhorar a sensibilidade e/ou a especificidade da detecção.

Quanto ao ensaio feito com anticorpos anti-ALT-2, este não conseguiu identificar infectados com microfilárias, mas detectou 57% dos indivíduos endêmicos normais negativos de uma área com alta infecção filarial. Segundo os autores, este ELISA pode ser útil na detecção precoce e específica de infecções filariais recém-instaladas em regiões endêmicas (RAVISHANKARAN et al., 2016). É importante destacar que das quatro possíveis combinações usando os anticorpos anti-rWb14, três não foram capazes de detectar pacientes

microfilarêmicos. Mas diferente do resultado do ELISA sanduiche para ALT-2, essas três combinações também não reconheceram os outros grupos de soros utilizados no trabalho.

Vale ressaltar que o extrato proteico de verme adulto de *W. bancrofti* foi produzido e descrito pela primeira vez por nosso grupo neste trabalho. Quando tal extrato foi utilizado no *western blot*, observou-se que os anticorpos policlonais reconheceram uma banda de aproximadamente 30kDa, enquanto o conjunto de soros MF detectou uma banda de 15 kDa. Aparentemente, esta última é importante para a infecção dada a sua forte detecção. A expectativa é que seja realizada uma separação do extrato de *W. bancrofti* por eletroforese bidimensional seguida de *western blot* com soros microfilarêmicos e identificação em espectrometria de massas das proteínas isoladas. A intenção é encontrar novos biomarcadores para a construção de proteínas quiméricas que poderão ser uma alternativa inovadora e promissora para o futuro do diagnóstico da FL, contribuindo assim com o PGEFL.

8. CONCLUSÃO

O objetivo do estudo foi avaliar anticorpos policlonais e monoclonais para o desenvolvimento de um teste diagnóstico para FL. Primeiramente, obteve-se sucesso na produção em larga escala dos anticorpos monoclonais e também na purificação dos anticorpos policlonais. Para testar a eficiência desses anticorpos no reconhecimento da Wb14 nativa, foi feito o extrato de verme adulto de *W. bancrofti*, primeiramente produzido e descrito no presente trabalho, o que irá permitir o desenvolvimento de posteriores análises.

A rWb14 foi reconhecida pelos anticorpos monoclonais, policlonais e também pelo soro de pacientes positivos para FL. Entretanto, quando se tratou do reconhecimento da proteína nativa presente no extrato, ambos os anticorpos e soro dos pacientes positivos não foram capazes de detectá-la, mas os testes realizados com os anticorpos policlonais mostraram uma banda de 30 kDa no extrato. Somado a isso, soros de pacientes microfilarêmicos reconheceram uma banda de aproximadamente 14kDa que será alvo na busca de novos biomarcadores pra essa doença.

A respeito da padronização do ELISA, quatro associações de anticorpos foram explorados, mas a que manifestou melhor reconhecimento, tanto da rWb14 quanto dos soros microfilarêmicos testados, foi aquela que usou o anticorpo policlonal anti-rWb14 como captura e o monoclonal 1H10 anti-rWb14 como detecção. Esse sistema detectou 1pg da rWb14 e 2/5 pacientes microfilarêmicos, mas pretende-se ampliar o número de amostras visando esclarecer a eficácia do teste em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABDUL RAHMAN, R.; HWEN-YEE, C.; NOORDIN, R. Pan LF-ELISA using BmR1 and BmSXP recombinant antigens for detection of lymphatic filariasis. **Filaria journal**, London, v. 6, n. 1, p. 10, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2883-6-10>. Acesso em: 19 dez. 2019.
- ALHASSAN, A. et al. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. **Trends in Parasitology**, United Kingdom, v. 31, n. 8, p. 391–400, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.04.006>. Acesso em: 22 dez. 2019.
- AMARAL, F. ET AL. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 6, p. 753–757, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.753>. Acesso em: 22 dez. 2019.
- ATHISAYA MARY, K. et al. Detection of filarial specific IgG4 antibodies in individuals residing in endemic areas using panLFRAPID test card. **Journal of Parasitic Diseases**, Lucknow, v. 35, n. 1, p. 77–79, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0021-z>. Acesso em: 22 dez. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da Filariose Linfática**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 80 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_filariose_linfatica.pdf. Acesso em: 22 dez. 2019.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL. **Biology, Parasites - Lymphatic Filariasis**, Atlanta: CDC, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/biology.html>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL. **DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern**, Atlanta: CDC, 2019. Disponível online em: <https://www.cdc.gov/dpdx/lymphaticfilariasis/index.html>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL. **Epidemiology & Risk Factors**, Atlanta: CDC, 2019. Disponível online em: <https://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/epi.html>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- CHANDRASHEKAR, R. et al. Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 261–271, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00035-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00035-2). Acesso em: 25 dez. 2019.

CHANDY, A. et al. A review of neglected tropical diseases: Filariasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Heidelberg, v. 4, n. 7, p. 581–586, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60150-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60150-8). Acesso em: 20 dez. 2019.

CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 96, n. 6, p. 1411–1420, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>. Acesso em: 22 dez. 2019.

DA SILVA JUNIOR, E. F. et al. Wuchereria bancrofti infection in Haitian immigrants and the risk of re-emergence of lymphatic filariasis in the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 256–259, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0407-2016>. Acesso em: 25 dez. 2019.

DE SOUZA, D. K. et al. An evaluation of Wb123 antibody elisa in individuals treated with ivermectin and albendazole, and implementation challenges in Africa. **Pan African Medical Journal**, Kampala, v. 27, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.27.65.11004>. Acesso em: 25 dez. 2019.

DREYER, G.; DREYER, P.; NOROES, J. - Recommendations for the treatment of bancroftian filariasis in symptomless and diseased patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 43–50, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000100009>. Acesso em: 26 dez. 2019.

DORKENOO, M. A. et al. Surveillance for lymphatic filariasis after stopping mass drug administration in endemic districts of Togo, 2010-2015. **Parasites and Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2843-3>. Acesso em: 26 dez. 2019.

FONTES G. et al. The microfilarial periodicity of Wuchereria bancrofti in northeastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 94, n.4, p. 373-379, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00034983.2000.11813552>. Acesso em: 26 dez. 2019.

FONTES G, BRAUN RF, FRAIHA NETO H, VIEIRA JBF, PADILHA SS, ROCHA RC, ET AL. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Rev Soc Bras Med Trop**, Maceió, v. 38, p. 131–6, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000200001>. Acesso em: 26 dez. 2019.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & vectors**, London, v. 5, p. 272, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-272>. Acesso em: 27 dez. 2019.

FREEDMAN, D. O. et al. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 37–41, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00666.x>. Acesso em: 27 dez. 2019.

GADELHA, C.A.G. **Seminário sobre Complexo Econômico-Industrial da Saúde**, BNDES, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <https://>

mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/clusters_arranjos_produtivos_locais_e_as_redes.html. Acesso em: 27 dez. 2019.

GORDON, C.; JONES, M.; MCMANUS, D. The History of Bancroftian Lymphatic Filariasis in Australasia and Oceania: Is There a Threat of Re-Occurrence in Mainland Australia? **Tropical Medicine and Infectious Disease**, Basel, v. 3, n. 2, p. 58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020058>. Acesso em: 27 dez. 2019.

GYAPONG, J. O. et al. Elimination of lymphatic filariasis: current perspectives on mass drug administration. **Research and Reports in Tropical Medicine**, Auckland, v. 9, p. 25–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/RRTM.S125204>. Acesso em: 20 dez. 2019.

JANARDHAN, S. et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against WbSXP-1 for the detection of circulating filarial antigens. **Journal of helminthology**, London, v. 85, n. 1, p. 1–6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000118>. Acesso em: 20 dez. 2019.

JAWAHARLAL, J. P. P. et al. Evaluation of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) as a diagnostic antigen for human lymphatic filariasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 78, n. 3, p. 249–254, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.019>. Acesso em: 18 dez. 2019.

JOHNSON, W. et al. Bulletin of the World Health Organization Stroke: a global response is needed. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 94, n. 9, p. 634–634, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2471/BLT.16.181636>. Acesso em: 18 dez. 2019.

JONGTHAWIN, J. et al. Morphological and genetic variation of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in carriers in Thailand, Lao PDR and Myanmar: evaluation using Giemsa-stained thick blood films. **Journal of Helminthology**, London, v. 94, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000865>. Acesso em: 18 dez. 2019.

KOUDOU, B. G. et al. Elimination of lymphatic filariasis in west African urban areas: is implementation of mass drug administration necessary? **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 18, n. 6, p. e214–e220, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30069-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30069-0). Acesso em: 18 dez. 2019.

KOMORENG, L. et al. An ethnobotanical survey of traditional medicinal plants used against lymphatic filariasis in South Africa. **South African Journal of Botany**, Phuthaditjhaba, v. 111, p. 12–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.005>. Acesso em: 11 dez. 2019.

KUBOFCIK, J.; FINK, D. L.; NUTMAN, T. B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 12, e1930, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001930>. Acesso em: 11 dez. 2019.

KUMAR, S.; KUMAR, A.; SETH, A. Potential medicinal plants for Lymphatic Filariasis: A review. **Innovare Academic Sciences**, Switzerland, v. 2, n. 1, p. 2–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/ffar.2021.633921>. Acesso em: 8 dez. 2019.

LALITHA, ET AL. Development of Antigen Detection ELISA for the Diagnosis of Brugian and Bancroftian Filariasis Using Antibodies to Recombinant Filarial Antigens Bm-SXP-1 and

Wb-SXP-1. **Microbiol. Immunol.**, Australia, v. 46, n. 5, p. 327–332, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02703.x>. Acesso em: 8 dez. 2019.

LAMMIE, P. J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. **Filaria journal**, England, v. 3, n. 1, p. 9, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2883-3-9>. Acesso em: 8 dez. 2019.

MELROSE, W. D. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. **Int J Parasitol**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 947–960, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00062-0). Acesso em: 9 dez. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Filariose Linfática (Elefantíase)**. Brasília. Disponível online em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/filariose-linfatica-elefantiose-1/filariose-linfatica-elefantiose>. Acesso em 19 jan. 2020.

MISHRA, S. et al. Hydrocele fluid: can it be used for immunodiagnosis of lymphatic filariasis? **Journal of vector borne diseases**, Delhi, v. 51, n. 3, p. 188–193, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25253211/>. Acesso em: 9 dez. 2019.

MOLYNEUX, D. Lymphatic Filariasis (Elephantiasis) Elimination: A public health success and development opportunity. **Filaria journal**, London, v. 2, n. 1, p. 13, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2883-2-13>. Acesso em: 5 dez. 2019.

MOLYNEUX, D. H.; ZAGARIA, N. Lymphatic filariasis elimination: progress in global programme development. **Annals of Tropical medicine & Parasitology**, London, v. 96, n. 2, p. 15-40, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/000349802125002374>. Acesso em: 6 dez. 2019.

MORE, S.J.; COPEMAN, D. B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. **Trop Med Parasitol**, Stuttgart, v. 41, p. 403–406, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2075384/>. Acesso em: 6 dez. 2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, **Wuchereria bancrofti**, NCBI 2019. Maryland. Disponível online em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6293>. Acesso em: 19 mar 2019.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia humana. 11. ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**. p. 299-307, 2005.

NORÕES, J. et al. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 90, n 1, p. 55–56, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(96\)90478-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(96)90478-2). Acesso em: 6 dez. 2019.

NUNES, L. V. et al. Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Acre, v. 6, n. 7, p. 521–526, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61081-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61081-2). Acesso em: 6 dez. 2019.

OMAR, N.; HAMIDON, N. H.; YUNUS, M. H. Generation and Selection of naïve Fab library for Parasitic Antigen : Anti- Bm SXP antibodies for lymphatic filariasis. San Diego, v. 65, n. 3, p. 346-354, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.1591>. Acesso em: 3 dez. 2019.

OTTESEN, E. A. Editorial: The Global PI Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 591–594, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00620.x>. Acesso em: 1 dez. 2019.

PANDEY, V. et al. Antigen detection assay with parasite specific monoclonal antibodies for diagnosis of lymphatic filariasis. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 412, n. 19–20, p. 1867–1873, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.029>. Acesso em: 1 dez. 2019.

PANDIARAJA, P. et al. Molecular characterization of a truncated antigen (Wb14) of SXP-1 of *Wuchereria bancrofti* from four endemic regions in India. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 125, n. 3, p. 236–243, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.01.027>. Acesso em: 2 dez. 2019.

PASTOR, A. **Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filarioses Linfáticas**. Tese de doutorado (Doutorado em Genética) – Instituto Aggeu Magalhães, Recife, p. 1-98, 2017.

PASTOR, A. F. et al. Evaluation of the recombinant antigens Wb14 and Wbt for the capture antibody diagnosis of lymphatic filariasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170435>. Acesso em: 1 dez. 2019.

PRADO, I. C. et al. Electrochemical immunosensor for differential diagnostic of *Wuchereria bancrofti* using a synthetic peptide. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 113, n. March, p. 9–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.045>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAHUMATULLAH, A. et al. Delineation of BmSXP antibody V-gene usage from a lymphatic filariasis based immune scFv antibody library. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 512–523, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.040>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAHUMATULLAH, A. et al. Development of an Antigen Detection ELISA for Bancroftian Filariasis Using Bm SXP-Specific Recombinant Monoclonal Antibody. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 101, n. 2, p. 436–440, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0034>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAO, K. V. N. et al. The *Wuchereria bancrofti* orthologue of *Brugia malayi* SXP1 and the diagnosis of bancroftian filariasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 71–80, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00231-5). Acesso em: 1 dez. 2019.

RAVISHANKARAN, R. et al. An evaluation of antigen capture assays for detecting active filarial antigens. **J Helminthol**, London, v. 89, n. 3, p. 352–358, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000157>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAVISHANKARAN, R. et al. Evaluation of immuno diagnostic assay for the exposure of stage specific filarial infection. **Acta Parasitologica**, Switzerland, v. 61, n. 2, p. 232–240, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0033>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAWLINSON, T. et al. From Haiti to the Amazon: Public Health Issues Related to the

Recent Immigration of Haitians to Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 3–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002685>. Acesso em: 2 dez. 2019.

ROCHA, A. Available laboratory diagnostic methods of lymphatic filariasis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 265–270, 2000. Disponível em: <https://doi.org/>. Acesso em: 2 dez. 2019.

ROCHA, A. et al. Circulating filarial antigen in the hydrocele fluid from individuals living in a bancroftian filariasis area - Recife, Brazil - Detected by the monoclonal antibody Og4C3-assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 101–105, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000100018>. Acesso em: 4 dez. 2019.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da Filariose Linfática: uma parceria da Secretaria de Saúde de Olinda-PE, Brasil, com o Serviço de Referência Nacional em Filarioses. **Revista De Patologia Tropical**, Goiás, v. 39, n. 3, p. 233–249, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-591471>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SCHUETZ, A. ET AL. Evaluation of the whole blood filariasis ICT test for short-term monitoring after antifilarial treatment. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 62, p. 502–503, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.502>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SHENOY, R. K. Clinical and pathological aspects of filarial lymphedema and its management. **Korean J. Parasitol.**, Seoul, v. 46, n. 3, p. 119-125, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.3.119>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SHENOY, R. K.; BOCKARIE, M. J. Lymphatic filariasis in children: Clinical features, infection burdens and future prospects for elimination. **Parasitology**, London, v. 138, n. 12, p. 1559–1568, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S003118201100117X>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SILVA, Maressa. **Produção de anticorpos monoclonais contra o antígeno rWb14 de *Wuchereria bancrofti***. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 1-48, 2017.

SIMONSEN, P. E.; MWAKITALU, M. E. Urban lymphatic filariasis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 35–44, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3226-x>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SMALL, S. T.; TISCH, D. J.; ZIMMERMAN, P. A. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of the filarial nematode *Wuchereria bancrofti*. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 28, p. 33–43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.018>. Acesso em: 4 dez. 2019.

SOUZA, P. **Monitoramento da infecção filarial por *Wuchereria bancrofti* através da cinética de anticorpos com o antígeno recombinante Bm14, em áreas endêmicas da RMRPE submetidas ao tratamento coletivo para filariose**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Recife, p. 1-69, 2012.

STEEL, C. et al. Antibody to the Filarial Antigen Wb123 Reflects Reduced Transmission and Decreased Exposure in Children Born following Single Mass Drug Administration (MDA). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. 1–8, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001940>. Acesso em: 4 dez. 2019.

STOCKS, M. E.; FREEMAN, M. C.; ADDISS, D. G. The Effect of Hygiene-Based Lymphedema Management in Lymphatic Filariasis-Endemic Areas: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1–19, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004171>. Acesso em: 7 dez. 2019.

SUPALI, T. et al. Detection of filaria-specific IgG4 antibodies using Brugia Rapid test in individuals from an area highly endemic for *Brugia timori*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 255–261, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.02.001>. Acesso em: 7 dez. 2019.

VESTERBERG, O. A short history of electrophoretic methods. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 1243–1249, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.11501401188>. Acesso em: 7 dez. 2019.

VIGILÂNCIA, S. DE. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Boletim Epidemiológico**. Brasília, v. 47, p. 1-5, 2016. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/>. Acesso em: 22 dez. 2019.

VISHAL, L. A. ET AL. Evaluation of Rapid Blood Sample Collection in the Detection of Circulating Filarial Antigens for Epidemiological Survey by rWbSXP-1 Capture Assay. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102260>. Acesso em: 7 dez. 2019.

WEIL GJ, LAMMIE PJ, W. N. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitol Today**, Amsterdam, v. 13, n. 10, p. 401–4, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01130-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01130-7). Acesso em: 5 dez. 2019.

WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. R. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 78–82, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.001>. Acesso em: 5 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. Annual Report on Lymphatic Filariasis. **Institutional Repository for Information Sharring**, Geneva, p. 81, 2002. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68984/WHO_CDS_CPE_CEE_2005.52.pdf. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring and epidemiological assessment of mass drug administration in the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. A manual for national elimination programmes. **World Health Organization**, Geneva, p. 1–100, 2011. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44580>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Managing Morbidity and Preventing Disability. **World Health Organization**, Geneva, p. 1–69, 2013. Disponível em:.. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique**

hebdomadaire, Geneva, v. 39, n. 91, p. 441–460, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/348851>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress report 2000-2009 and strategic plan 2010-2020 of the global programme to eliminate lymphatic filariasis: halfway towards eliminating lymphatic filariasis. **WHO Press, World Health Organization**, Geneva, p. 1–93, 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44473>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION– 2019a. **Epidemiology**, Geneva. Disponível online em: https://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/epidemiology_clinical_forms/en/. Acesso em: 19 mar 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – 2019b. **Treatment**, Geneva. Disponível online em: https://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/treatment/en/. Acesso em: 19 mar 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – 2020. **Lymphatic filariasis**, Geneva, Disponível online em: [_https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis). Acesso em: 20 jan 2020.

WITT, C.; OTTESEN, E. A. Lymphatic filariasis: An infection of childhood. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 582–606, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00765.x>. Acesso em: 5 dez. 2019.

WON, K. Y. et al. Comparison of antigen and antibody responses in repeat lymphatic filariasis transmission assessment surveys in American Samoa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006347>. Acesso em: 5 dez. 2019.