

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

André Filipe Pastor da Silva

**Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para
desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filarioses
Linfáticas.**

Recife
2017

André Filipe Pastor da Silva

**Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para o
desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filarioses
Linfáticas.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Rafael Dhalia

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

Silva, André Filipe Pastor da

Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento de testes de diagnóstico para filariose linfáticas/ André Filipe Pastor da Silva - 2017.

97 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rafael Dhalia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Filariose 2. Testes imunológicos 3. Wuchereria bancrofti I. Dhalia, Rafael (orient.) II. Título

616.9652

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-166

André Filipe Pastor da Silva

**Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento
de testes de diagnóstico para Filarioses Linfáticas.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em 31/08/2017

Banca Examinadora:

Dr. Rafael Dhalia

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ/PE

Dr. Tercílio Calsa-Júnior

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Clarice Lins

Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ/PE

Dr. Zulma Medeiros

Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ/PE

Dr. Christian Robson Reis

Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ/PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e amigos que me ajudaram simplesmente pelo fato de serem especiais para mim, e também pelos ouvidos sempre disponíveis nas horas de desabafo. A Rafael Dhalia, Abraham Rocha, Osvaldo Pompílio e aos pesquisadores participantes do projeto, fico muito grato pelos ensinamentos obtidos durante esses 4 anos e meio. Quanto àquelas que me auxiliaram na parte experimental, meus agradecimentos sinceros vão primeiramente a Marli Tenório, com quem eu pude conviver um pouco e absorver bastante conhecimento, do tanto que ela possui e faz questão de repassar. Marli com toda sua experiência e tranquilidade, me fez acreditar que o projeto era factível, me ensinou bastante e foi essencial para que eu pudesse concluir o Doutorado. Segundo, eu agradeço a Maressa Rhuama, que apesar de me fazer ganhar mais alguns cabelos brancos, foi minhas mãos no Laboratório quando eu não pude estar presente fisicamente.

Institucionalmente, agradeço ao PPGG-UFPE pelo conhecimento teórico conseguido desde 2011, quando iniciei o mestrado. Com relação a parte laboratorial do projeto, especialmente tenho muito orgulho de ter dedicado 10 anos da minha vida ao LaViTE/FIOCRUZ-PE, um lugar que sempre me acolheu muito bem e que verdadeiramente é minha casa científica. Apesar da alegria em fechar um ciclo tão importante pessoal e profissional, terminar o Doutorado vai fazer com que eu sinta falta de estar no LaViTE. Mas ao mesmo tempo é um orgulho muito grande ter feito parte desse grupo. Fica agora a minha torcida pelos amigos que ainda estão ao longo desta caminhada.

Além disso, incluo nos meus agradecimentos a CAPES, agência que me garantiu a bolsa enquanto eu recebi. E por fim, a FACEPE, órgão que financiou o projeto, sob o código: APQ-0058-4.00/13.

RESUMO

A Filariose Linfática (FL) é uma doença que afeta 120 milhões de pessoas no mundo, sendo a *Wuchereria bancrofti* (WB) o agente etiológico no Brasil. O diagnóstico apresenta inúmeras dificuldades, como horário de coleta para exames parasitológicos (entre 23h-1h), problemas de importação e altos custos para kits de imunodiagnóstico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir antígenos recombinantes e anticorpos para o desenvolvimento de diagnósticos para FL. Para tanto, a partir dos antígenos recombinantes Wb14 e WbT foram desenvolvidos dois testes de captura de anticorpos IgG4, os ELISAs anti-Wb14 e anti-WbT. Além disso, foram produzidos anticorpos policlonais e monoclonais contra a proteína rWb14, que deram origem a um ELISA sanduiche de captura de antígenos. Os testes ELISA anti-Wb14 e anti-WbT mostraram sensibilidade e especificidade semelhantes ao Og4C3, POC-ICT e melhor especificidade do que o kit comercial de captura de anticorpos, o BM14. Enquanto que o ELISA sanduiche desenvolvido mostrou ser uma opção viável para o diagnóstico da LF, pois detectou até 15ng rWb14. Devido a importância do imunodiagnóstico para avaliar o Programa Global para a eliminação da Filariose Linfática (PGELF), os testes propostos aqui aparecem como uma ótima alternativa. A expectativa é o ELISA sanduiche reconheça os indivíduos MF e que os ELISAs anti-Wb14 e anti-WbT sejam testados por outros grupos de pesquisas para validar os kits como eficientes em diferentes países endêmicos.

Palavras chave: Imunodiagnóstico. *Wuchereria bancrofti*. ELISA. biotecnologia.

ABSTRACT

Lymphatic filariasis (LF) is a parasitic disease caused mainly by *Wuchereria bancrofti* that affects 120 million of people in the world. The diagnosis presents numerous difficulties, such as the hour to collect samples for parasitological exams (between 11 pm and 1 am) and high costs of immunodiagnostic kits. Thus, the objective of this work is to produce recombinant antigens and antibodies for the development of FL diagnoses. To this end, two IgG4 antibody capture assays were prepared from the recombinant Wb14 and WbT antigens, the anti-Wb14 and anti-WbT ELISAs. In addition, polyclonal and monoclonal antibodies were raised against the rWb14 protein, resulting in an antigen capture sandwich ELISA. Anti-Wb14 and anti-WbT ELISAs showed sensitivity and specificity similar to Og4C3, POC-ICT and better specificity than the commercial antibody capture kit, BM14. While the sandwich ELISA was shown to be a viable option for LF diagnosis, because it detected up to 15ng rWb14. Due to the immunodiagnosis importance to evaluate the Global Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (PGELF), the tests proposed here appear as a great alternative. The expectation is that the ELISA sandwich recognizes the MF individuals and that the anti-Wb14 and anti-WbT ELISAs be tested by other research groups to validate these assays as effective in different endemic countries.

Key words: Immunodiagnostic. *Wuchereria bancrofti*. ELISA. biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA TERAPIA PREVENTIVA PARA A FILARIOSE LINFÁTICA EM TODO O MUNDO.....	14
FIGURA 2 - CICLO BIOLÓGICO DA <i>WUCHERERIA BANCROFTI</i>	15
FIGURA 3 - VERMES ADULTOS DE <i>WUCHERERIA BANCROFTI</i>	16
FIGURA 4 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA FILARIOSE LINFÁTICA.....	18
FIGURA 5 - TÉCNICA DE GOTA ESPESSA NÃO MENSURADA.....	20
FIGURA 6 - KIT DE DIAGNÓSTICO CELISA TEST.....	22
FIGURA 7 - KIT EISA OG4C3.....	24
FIGURA 8 - CARTÃO ICT. EM DESTAQUE RESULTADO POSITIVO.....	25
FIGURA 9 - QUADRO EXPLICATIVO DO TRATAMENTO EM MASSA PARA FILARIOSE LINFÁTICA (DO INGLÊS, <i>MASS DRUG ADMINISTRATION</i> MDA).....	28

ARTIGO 1

FIGURE 1 - POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS EVALUATING THE AFFINITY PURIFIED WB14 AND WBT RECOMBINANT POLYPEPTIDES.....	46
FIGURE 2 - ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) EVALUATING THE RECOGNITION OF THE TWO RECOMBINANT PROTEINS BY DIFFERENT GROUPS OF FL RELATED SERA.....	47
FIGURE 3 - EVALUATION OF THE ANTIBODY TITER AGAINST THE WB14 AND WBT RECOMBINANT ANTIGENS AT DIFFERENT TIME PERIODS AFTER DEC TREATMENT.....	48

ARTIGO 2

FIGURE 1 - DILUTION CURVES OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RWB14 AND WBT.....	55
FIGURE 2 - RWB14 AND RWBT ANTIGENS DILUTION CURVE ELISA TO MONOCLONAL ANTIBODIES.....	56
FIGURE 3 - DILUTION CURVES OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST RWB14 AND RWBT.....	56
FIGURE 4 - SANDWICH ELISA FOR RWB14.....	57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 - SUMMARY OF THE DATA FROM THE VARIOUS TESTS PERFORMED IN ORDER TO COMPARE THEIR PERFORMANCE FOR THE DIAGNOSIS OF LYMPHATIC FILARIASIS.....	49
---	----

LISTRA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
FL	Filariose Linfática
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGEFL	Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática
DEC	Dietilcarbamazina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MDA	Mass drug administration
PNEFL	Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
ADL	Adeno-linfangite retrógrada
EPT	Síndrome da eosinofilia pulmonar tropical
MF	Microfilaria ou Microfilarêmicos
VA	Vermes adultos de <i>W. bancrofti</i>
SRNF	Serviço de Referência Nacional em Filarioses
ACF	Antígenos Circulantes Filariais
OD	Densidade Óptica
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RMR	Região Metropolitana do Recife
AcMo	Anticorpos monoclonais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 HISTÓRICO DA FL E SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL.....	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA FL.....	13
2.3 CICLO BIOLÓGICO DA <i>WUCHERERIA BANCROFTI</i>	15
2.4 FORMAS CLÍNICAS.....	17
2.5 DIAGNÓSTICO.....	18
2.6 TRATAMENTO.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
4 ARTIGO 1 - Evaluation of the recombinant antigens Wb14 and WbT for the capture antibody diagnosis of lymphatic filariasis.....	30
5 ARTIGO 2 - Development and carachterization of polyclonal and monoclonal antibodies against Wb14 for the detection of circulating filarial antigens.....	50
6 DISCUSSÃO GERAL.....	68
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A - REGRAS DA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	82
ANEXO B - CURRÍCULO LATTES.....	87

1 INTRODUÇÃO

A Filariose Linfática (FL) é uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o helminto da espécie *Wuchereria bancrofti* o agente etiológico no Brasil. Esta parasitose é a segunda maior causa de incapacidades físicas a longo prazo, representadas pela hidrocele e linfedema. A dificuldade na realização do diagnóstico, a falta de saneamento básico e a alta densidade populacional de vetores fazem desta uma endemia de difícil controle e erradicação.

Os inquéritos epidemiológicos visam descrever a distribuição de uma doença na região estudada, e durante sua realização é necessário aplicar exames diagnósticos para determinar a prevalência. Graças a periodicidade apresentada pelas microfilárias, a coleta sanguínea deve ser realizada entre 23h e 01h para aumentar a sensibilidade dos exames parasitológicos. Isso resulta em dificuldade de execução das técnicas como rotina laboratorial e sua aplicação em tais inquéritos.

No entanto, a pesquisa de antígenos e anticorpos em ensaios sorológicos não apresenta essa limitação temporal, podendo a amostra ser coletada durante qualquer momento do dia. No entanto, os kits de diagnóstico utilizados na rotina, CELISA BM14, POC-ICT e Og4C3-ELISA, não são produzidos no Brasil, apresentam problemas de reprodutibilidade dos resultados, persistência da positividade por longos períodos mesmo com eliminação da infecção, além do custo elevado, gerando grandes ônus aos cofres públicos.

Portanto, o presente trabalho objetiva a produção de antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filarioses Linfáticas. A intenção é detectar a infecção filarial com rapidez e eficácia, apresentando potencial aplicação dentro do SUS a um baixo custo. Isso permitirá aos órgãos de saúde ampliar a sua capacidade de análise e intervenção, através de inquéritos epidemiológicos seguros para o direcionamento de ações epidemiológicas, além de diminuição de gastos com importação e melhora na reprodutibilidade dos testes. Somado a isso, pretende-se também que estes testes sejam utilizados para auxiliar o PGEFL (OMS).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA FL E SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL

Devido ao clima favorável e densidade de vetores, historiadores afirmam que, a filariose pode ter surgido há muitos anos atrás em locais como Egito e África. A microfilária foi a primeira forma evolutiva a ser encontrada em 1863 por Demarquay ao analisar o líquido hidrocele de um de seus pacientes. Em seguida, as microfilárias foram evidenciadas em outros líquidos como urina e sangue, por Otto Wucherer e Timothy Lewis, respectivamente. Quanto ao verme adulto, em 1877, Joseph Bancrofti, ao analisar o fluido de um paciente com abscesso no braço, visualizou os vermes. Porém, somente em 1921 o termo *Wuchereria bancrofti* foi aceito (GURGEL et al., 2010; WUCHERER, 1868).

Após a descrição da *W. bancrofti*, o pesquisador Brug recebeu amostras de microfilárias da Indonésia que eram diferentes das microfilárias dessa espécie. Então, em 1940 os pesquisadores RAO e Mapleston encontraram na Índia, microfilárias e vermes adultos da mesma espécie descrita pelo pesquisador Brug anteriormente. Mais tarde, em 1960, devido as diferenças entre as filárias, foi criado um novo gênero conhecido até hoje por *Brugia*, que inclui as *Brugia malayi* e *Brugia timori* (FIOCRUZ, 2007).

No Brasil apenas a espécie *W. bancrofti* causa a filariose linfática (FL). Os primeiros relatos de inquéritos para FL realizados aqui são de 1951, quando o Ministério da Saúde e Educação instituiu o programa de combate à doença. Entre 1951 e 1958 foram efetuados inquéritos em 538 localidades, sendo encontrados portadores de microfilaremia em 89 regiões (16,5%). No entanto, em apenas 11 cidades (Manaus, Belém, São Luís, Recife, Maceió, Salvador, Castro Alves, Florianópolis, Ponta Grossa, Barra de Laguna e Porto Alegre) ficou comprovada a transmissão ativa por meio do encontro simultâneo de mosquitos com larvas infectadas e indivíduos parasitados (RACHOU, 1956, 1957).

Com os avanços no controle da FL, atualmente apenas a Região Metropolitana do Recife (RMR) permanece como foco de transmissão ativa desta endemia, apesar de ter sido a primeira cidade a aderir ao tratamento coletivo. Isso reforça a grande dificuldade encontrada em eliminar a infecção bancroftiana (AGUIAR-SANTOS et al., 2013).

Mais recentemente um novo problema surgiu no controle da filariose no Brasil. Sendo este um país de boas oportunidades trabalhistas e levando em consideração as catástrofes naturais e a situação econômica do Haiti, muitos Haitianos imigraram para o Brasil. O Haiti é o país da América com maior número de casos da FL por *W. bancrofti*, com prevalência de 10% da população infectada. Como essa migração está acontecendo em números elevados, cerca de 6 milhões desde 2010, fica difícil o controle da entrada de pessoas com infecção bancroftiana. Muitas delas têm

como destino final grandes centros urbanos, como São Paulo e Manaus, que são regiões não endêmicas. No entanto, como há a presença do vetor transmissor, o *Culex quinquefasciatus*, a possibilidade de iniciação do ciclo biológico da *W. bancrofti* é viável, levando à recirculação em áreas que conseguiram eliminar a transmissão da doença anteriormente (RAWLINSON et al., 2014). Em um trabalho realizado no Acre, região Norte do Brasil, foi observado 4% (15/375) de infectados oriundos do Haiti residentes no estado (NUNES et al., 2016). Extrapolando estes dados, se pensarmos que 6 milhões de pessoas entraram no País entre 2010 e 2014, e considerarmos que 4% delas estejam infectadas, 240.000 pessoas portadoras de *W. bancrofti* entraram no Brasil neste período.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA FL

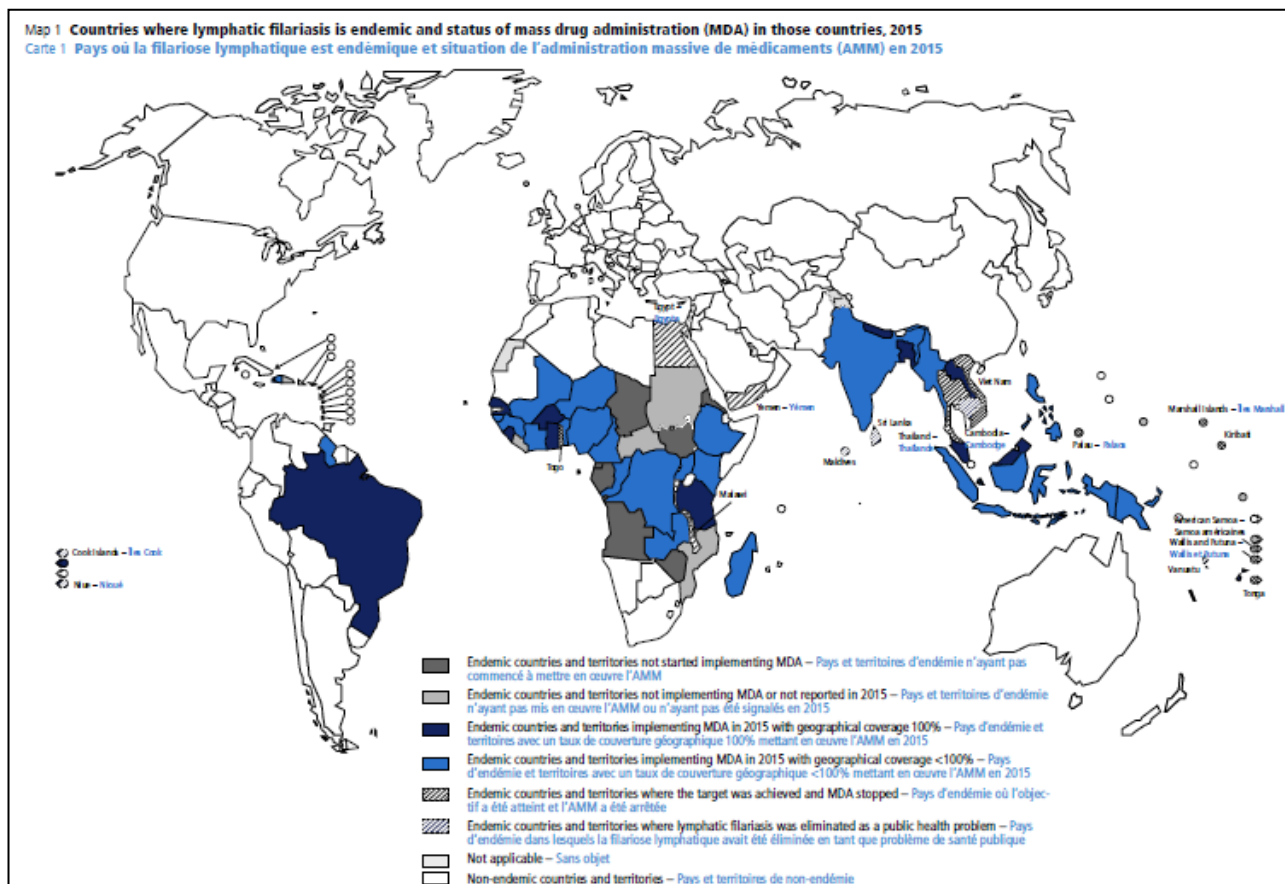
A filariose linfática, popularmente conhecida por elefantíase, é uma parasitose humana de regiões tropicais e subtropicais do mundo causada por três diferentes espécies de nematódeos: *W. bancrofti*, *B. malayi* e *B. timori* (MWAKITALU et al., 2013). No Brasil, apenas a espécie *W. bancrofti* é encontrada e sua transmissão ocorre através do repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito *C. quinquefasciatus*, que atua como vetor no ciclo biológico da doença (BRASIL, 2009).

Estima-se que cerca de 1,4 bilhões de pessoas no mundo encontram-se sob o risco de adquirir filariose linfática. Atualmente, 120 milhões de pessoas ainda estão infectadas em mais de 70 países classificados como endêmicos, por exemplo Índia, Nigéria e Etiópia (figura 1). Destes, aproximadamente 112 milhões estão infectados com *W. bancrofti*, enquanto o restante apresenta os vermes do gênero *Brugia* (WHO, 2016). De um total de 40 milhões de pessoas afetadas pelas morbidades da doença, aproximadamente 15 milhões apresentam a forma crônica e sintomática, linfedema, popularmente conhecido por elefantíase (CANO et al., 2014).

Levando em consideração a grande quantidade de pessoas afetadas e a possibilidade real de erradicação desta helmintose, em 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a FL uma das seis doenças infecciosas potencialmente elimináveis e, em 2000, foi lançado o Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) (WHO, 2012). O PGEFL tem como objetivo a eliminação da transmissão da doença até o ano de 2020, partindo de duas estratégias primordiais: 1) Administração de droga em massa, do inglês *mass drug administration (MDA)*, com foco na interrupção da transmissão da doença a partir da administração de drogas em associação; 2) Prevenção de incapacidade e morbidade, do inglês *morbidity management and disability prevention (MMDP)*, com foco na qualidade de serviços de assistência oferecidos aos indivíduos afetados pela doença (ICHIMORI, 2014). De acordo com os dados mais recentes, o PGEFL tem englobado cerca de 55 países endêmicos e mais 20 novos em 2015, e durante os 15 anos de atuação do programa

(2000-2015) cerca de 6,2 bilhões de pessoas de regiões endêmicas foram tratadas pela MDA, sendo mais de 500 milhões de Janeiro a Setembro de 2015 (WHO, 2016).

Figura 1 - Distribuição da terapia preventiva para a filariose linfática em todo o mundo.



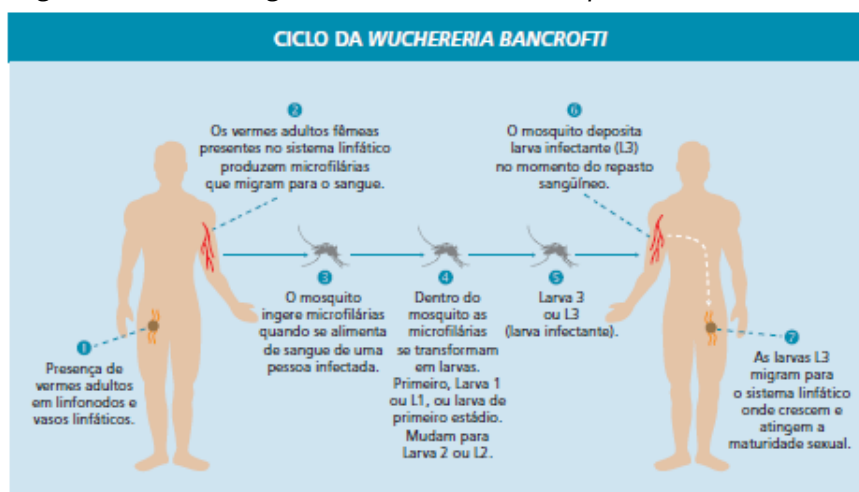
Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS) Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, WHO, 2016.

Guiado pelo PGEFL, o Brasil estabeleceu o Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), adotando como estratégia o tratamento em massa através da terapia antifilarial isolada por meio da droga citrato de dietilcarbamazina (DEC), em população alvo com antigenemia ou microfilaremia, acima de 1%. Recebendo destaque por muitos anos pelos avanços em pesquisas ligadas a filariose linfática, um grupo de pesquisadores e técnicos laboratoriais do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foi então credenciado oficialmente pelo Ministério da Saúde em 2002, como Serviço de Referência Nacional em Filarioses (SRNF). O serviço contempla atividades de diagnóstico, monitoramento dos casos positivos e assistência médica aos indivíduos infectados por filariose linfática. Além de auxiliar o PNEFL na reavaliação de focos extintos que aderiram ao programa nas décadas de 1960 a 1980, com o objetivo de certificar a eliminação da doença (ROCHA et al., 2010).

2.3 O CICLO BIOLÓGICO DA *WUCHERERIA BANCROFTI*

A filariose linfática apresenta um ciclo biológico heteroxênico, ou seja, ocorre em dois tipos de hospedeiros: vertebrado (homem) e invertebrado (vetor-mosquito); e se inicia pela hematofagia de fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus* nos portadores da doença (figura 2) (BRASIL, 2009). O mosquito ingere as microfilárias que seguem para o estômago e horas depois para os músculos torácicos, onde irão sofrer as mudas larvais. Após cerca de 15 dias, ocorre o desenvolvimento do último estágio, L3, o infectante. As larvas L3 se dirigem até a probóscida, aparelho picador do mosquito, aguardando o próximo repasto sanguíneo, momento no qual irão penetrar no hospedeiro vertebrado. No homem, as larvas infectantes irão migrar para os vasos linfáticos até se tornarem vermes adultos, o que ocorre cerca de meses depois, onde machos e fêmeas irão copular, e assim as fêmeas grávidas originarão as primeiras microfilárias (RAWLINSON et al., 2014).

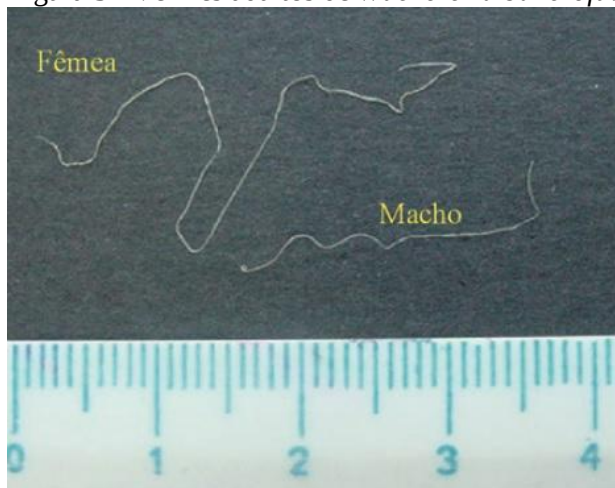
Figura 2 - Ciclo biológico da *Wuchereria bancrofti*.



Fonte: BRASIL, 2009.

O parasita se apresenta em três formas evolutivas: verme adulto (figura 3), microfilária (MF) e larval. Os vermes adultos são responsáveis pela expressão sintomatológica da doença, uma vez que albergam vasos e gânglios linfáticos do hospedeiro, prejudicando a circulação sanguínea e promovendo reações inflamatórias (BRASIL, 2009). Por muito tempo se pensou que os vermes adultos, mortos ou vivos, eram os responsáveis pela obstrução desses vasos, seguida pela dilatação dos mesmos, conhecida por linfangiectasia. Contudo, foi comprovado pela utilização de ultrassom, de forma pioneira no Brasil, que estes promovem a dilatação de forma não obstrutiva (DREYER et al., 2009).

Figura 3 - Vermes adultos de *Wuchereria bancrofti*.



Fonte: BRASIL, 2009.

Os vermes adultos, machos e fêmeas, possuem corpo longo e delgado de coloração branco leitosa e aspecto opaco. A fêmea é maior e mais espessa, apresentando um comprimento que varia de 7 a 10cm e 0,3mm de diâmetro (figura 3). Quanto à estrutura, possui órgãos genitais duplos, com exceção da vagina, que é única e se exterioriza em uma vulva localizada próximo à extremidade anterior do parasito. O macho é menor e menos espesso medindo 3,5 a 4cm de comprimento e 0,1mm de diâmetro, apresentando extremidade anterior afilada e posterior enrolada ventralmente (figura 3) (FONTES et al., 2005).

As microfilárias representam os embriões das fêmeas e são revestidas por uma membrana flexível conhecida por bainha. Sua presença atua como peça chave no diagnóstico diferencial de outros filarídeos encontrados no sangue, uma vez que é uma especificidade da *W. bancrofti* (ROCHA et al., 2004). Quanto a sua localização, por um mecanismo ainda não descoberto, as microfilárias ao serem eliminadas pelas fêmeas grávidas, migram do interior dos vasos linfáticos para os capilares profundos, principalmente dos pulmões e ali se hospedam até o início da madrugada, onde atingem a circulação periférica por volta da 00h, retornando aos vasos mais profundos somente ao amanhecer. Este fenômeno é conhecido como periodicidade noturna, sendo o momento de coleta sanguínea para os testes parasitológicos. Já as larvas de *W. bancrofti* hospedam-se no mosquito, principalmente do gênero *Culex*, onde ocorrem as mudas até atingir o estágio infectante, conhecido como larva L3 (FONTES et al., 2005; ROCHA et al., 2004).

Um fato curioso e ainda não justificado totalmente entre o ciclo biológico e o vetor, é a periodicidade noturna das microfilárias no sangue periférico do hospedeiro humano. Durante o dia, as microfilárias estão localizadas nos capilares profundos, principalmente nos pulmões, e, somente à noite, as mesmas irão migrar para sangue periférico, representando o pico de microfilaremia. O

mesmo coincide com o hábito preferencial da realização da hematofagia do *Culex*, que também ocorre no mesmo horário (entre as 23h e 01h) (FONTES et al., 2005).

2.4 FORMAS CLÍNICAS

A FL apresenta uma grande diversidade clínica, sendo os vermes adultos e a resposta inflamatória do hospedeiro contra as microfilárias os principais responsáveis pela expressão diferente da doença. De uma forma mais simplificada, há quatro principais formas: doença subclínica, manifestações agudas, manifestações crônicas e eosinofilia pulmonar tropical (EPT) (DREYER et al, 2009).

Na maioria dos casos, a forma subclínica está associada a presença de microfilárias, e mesmo conhecidos por assintomáticos, os indivíduos frequentemente apresentam algum tipo de dano nos vasos linfáticos, como proliferação e dilatação do endotélio ou comprometimento renal, pela presença de hematúria (sangue na urina) (FONTES et al., 2005).

As formas agudas e crônicas caracterizam a doença filariose linfática. A aguda é associada à adeno-lingite retrógrada (ADL) – presença de nódulos nas regiões axilar, inguinal e epitrocleana (região interna do cotovelo) com episódios febris e mal estar. Enquanto isso, a forma crônica, desenvolvida após anos e conhecida como a mais debilitante, apresenta manifestações clínicas como: elefantíase, hidrocele, quilúria e linfedema (figura 4). Bactérias e fungos também podem estar presentes nessas manifestações, agravando-as, uma vez que a disfunção linfática predispõe ao surgimento de infecções secundárias, como a erisipela (NUTMAN et al, 2013; DREYER et al., 2000).

A elefantíase (aumento de origem patológica no volume de membros, principalmente inferiores) representa a manifestação crônica mais conhecida e está associada à inflamação. Por outro lado, a hidrocele, acúmulo de líquido na região escrotal, é considerada a manifestação mais comum e ocorre por muitas vezes sem a presença de episódios inflamatórios (BABU; NUTMAN, 2012). A quilúria pode ser entendida como uma ruptura seguida por uma fistulização de vasos linfáticos dilatados dentro de qualquer segmento urinário, levando ao extravasamento da linfa evidenciada na urina. Quanto ao linfedema, este é o acúmulo de líquidos nos membros inferiores ou superiores devido a um bloqueio linfático. É válido salientar que contraditoriamente às formas subclínica e aguda, a forma crônica apresenta uma microfilaremia diminuta ou ausente (DREYER et al., 2007).

Figura 4 - Manifestações clínicas da Filariose Linfática. a. Hidrocele em estágio inicial em um garoto. b. Hidrocele em estágio avançado em um adulto c. Elefantíase em seio feminino. d. Elefantíase na perna. e. Elefantíase na perna em estágio avançado.



Fonte: CHRISTIANA et al., 2014.

A síndrome da eosinofilia pulmonar tropical (EPT), caracterizada pela hipereosinofilia e aumento do IgE, ocorre a partir de uma resposta imunológica exarcebada à antígenos filariais. Isso leva a uma série de eventos clínicos no pulmão, que vão desde o surgimento de abscessos ricos em eosinófilos e microfírias a fibroses crônicas, acarretando no comprometimento do órgão (FONTES et al., 2005).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico para filariose linfática será abordado de forma mais detalhada devido à grande diversidade de técnicas e usos. Algumas metodologias são utilizadas tanto na rotina quanto em inquéritos epidemiológicos, auxiliando no controle e erradicação da doença. Apesar de existirem muitas maneiras de diagnosticar a FL, até agora nenhum teste mostrou-se ser totalmente eficaz, o que motiva a pesquisa científica na área (ALHASSAN et al., 2015). Isso promove o desenvolvimento de novos kits de diagnóstico com o intuito de produzir testes mais seguros, rápidos e economicamente viáveis, justamente o objetivo do presente trabalho. De uma forma mais

didática, este tópico será explorado em três categorias: diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular.

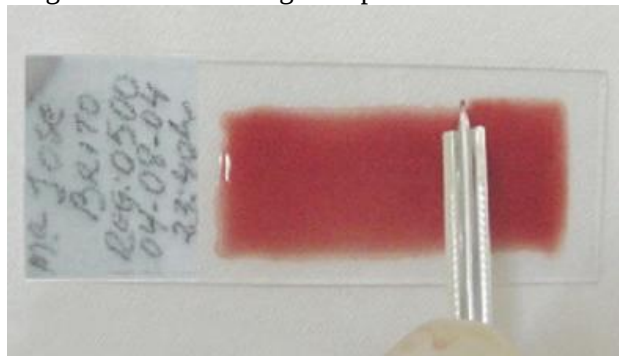
-Parasitológico

O diagnóstico parasitológico baseia-se na identificação de microfilárias em fluidos corpóreos como sangue, urina (hematúria ou quilúria) e líquidos sinoviais, quilocélicos e hidrocélicos. Como vantagem tem o baixo custo, porém a necessidade de um observador competente é requerida para a correta identificação das microfilárias, sem contar com a obrigatoriedade de serem realizados durante a periodicidade das microfilárias (entre 23h e 1h da manhã) (BRASIL, 2009).

As técnicas utilizadas são gota espessa, filtração de sangue em membrana de polycarbonato e concentração de Knott. A mais usada é a gota espessa (figura 5), uma técnica de caráter qualitativo que mostra-se prática e de baixo custo, sendo amplamente utilizada nos inquéritos epidemiológicos. Porém, sua sensibilidade deixa a desejar quando se trata de pacientes com baixa microfilaremia. As demais técnicas são conhecidas como técnicas de concentração e apresentam uma sensibilidade maior em comparação com a gota espessa, mas com um custo mais elevado (BRASIL, 2009; FONTES et al., 2005).

A técnica da gota espessa é extremamente simples necessitando apenas de uma lanceta para a realização da punção capilar, que deve ser feita, preferencialmente, no dedo anelar lateralmente à extremidade digital. A punção deve ser rápida e precisa, evitando sempre áreas edemaciadas ou com ferimentos. Em uma lâmina (limpa, desengordurada e identificada com as informações do paciente) coloca-se três gotas de sangue, então com o auxílio da mesma lanceta deve-se formar um retângulo homogêneo. A lâmina seca será corada com Giemsa e então poderá ser lida utilizando um microscópio óptico (figura 5). Há ainda outra modalidade quantitativa chamada gota espessa mensurada. A única diferença é o uso de um tubo capilar com volume calibrado em 20µl e um bulbo de borracha para auxiliar a transferência do sangue por capilaridade até a lâmina (BRASIL, 2009).

Figura 5 - Técnica de gota espessa não mensurada.



Fonte: BRASIL, 2009.

A técnica de filtração em membrana de polycarbonato pode ser facilmente entendida como a passagem do sangue, obtido pela punção venosa, em uma membrana, retendo as microfilárias. Porém, esta apresenta a desvantagem da possibilidade de outras estruturas se misturarem às microfilárias durante a filtração, dificultando a identificação das mesmas. Já a concentração de Knott, é uma técnica mais antiga onde o sangue é diluído na proporção de 1:9 de formalina a 2%, seguido pela centrifugação para obtenção do sedimento e preparação da lâmina. Assim como a técnica anterior, a utilização de um sedimento pode atrapalhar a visualização das microfilárias (MEDEIROS; MARTINS, 2010).

O diagnóstico por imagem, uma novidade até então, surgiu em 1994 com achados de vermes adultos filariais em vasos linfáticos escrotais através da técnica de ultrassonografia (AMARAL et al., 1994). Dois anos depois, também foi realizado um estudo sobre a ocorrência e caracterização de vermes adultos de *W. bancrofti* em homens microfilarêmicos no Recife, onde a “dança da filária“, caracterizada por um movimento peculiar exercido pelos vermes, foi evidenciada nas ultrassonografias dos envolvidos na pesquisa (NORÕES et al., 1996). Outros relatos importantes foram observados nesse trabalho, como a correlação entre a microfilaremia alta e a presença desses vermes adultos na região escrotal, o que pode auxiliar o diagnóstico da infecção filarial nos estágios iniciais.

A sensibilidade da ultrassonografia como método de diagnóstico foi testada em outro trabalho e obteve 73,44% em comparação com a pesquisa de antígenos que demonstrou 100% de sensibilidade na detecção de homens microfilarêmicos no Recife. Assim, o estudo foi capaz de demonstrar que apesar da aplicação na área clínica, sua sensibilidade como método de diagnóstico é satisfatória, porém apenas efetiva quando em associação à outros métodos como o parasitológico e imunológico (ROCHA et al., 2009).

Esses achados demonstram a importância do diagnóstico por imagem como método não invasivo, permitindo a identificação precoce da infecção filarial antes do surgimento dos sintomas,

fato este evidenciado muitas vezes nos indivíduos microfilarêmicos assintomáticos. Ao mesmo tempo esta metodologia é importante no monitoramento do tratamento em massa, avaliando o critério de cura pela redução dos vermes adultos nos vasos linfáticos após terapia anti-filarial (ROCHA et al., 2009).

- Imunológico

O diagnóstico imunológico pode ser realizado de duas formas: através da pesquisa de antígenos ou de anticorpos circulantes. Diante da dificuldade em diagnosticar pacientes com microfilaremia reduzida devido ao uso de drogas antifilarias ou microfilaremia ausente, como por exemplo, em pacientes crônicos ou com quadros de EPT, o diagnóstico sorológico é o método de escolha. Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido feitos com objetivo de melhorar a acurácia dos testes sorológicos, a partir da identificação de novos biomarcadores e desenvolvimento de kits de diagnósticos mais sensíveis para captura desses antígenos e anticorpos circulantes (SILVA et al., 2008).

- Pesquisa de Anticorpos circulantes

No passado, o uso de métodos para captura de anticorpos filariais não era tão frequente devido a dificuldades na reprodutibilidade dos testes. Uma série de problemas foi relatada em relação à especificidade e sensibilidade das técnicas, como por exemplo, o surgimento de reações cruzadas ao utilizar extratos brutos de vermes adultos de *W. bancrofti* ou *B. malayi*, além da dificuldade de distinguir corretamente indivíduos com infecção ativa daqueles com infecção passada ou inexistente (HARNETT; GARATE, 1998; CHANTEAU et al., 1994).

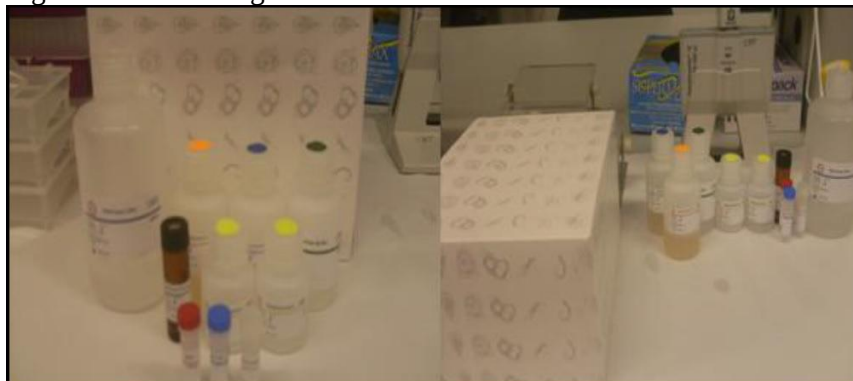
A utilização dos antígenos recombinantes filariais pode ser considerado um divisor de águas no desenvolvimento de diagnósticos que avaliam a resposta humoral na filariose linfática. A partir destas proteínas purificadas, foi possível produzir testes mais específicos e sensíveis, pois tratam-se de antígenos individuais direcionados a anticorpos filarias específicos, sobretudo o IgG4 (DISSANAYAKE et al., 1993; LAMMIE et al., 2004).

Os antígenos Bm14 e WbSXP-1, provenientes do estágio microfilarial (MF), foram selecionados a partir da mesma biblioteca de DNA complementar apresentando genes relacionados na produção de proteínas imunógenas envolvidas em infecções por helmintos filariais. Estudos demonstraram a eficácia do uso desses antígenos recombinantes no diagnóstico imunológico para filariose linfática baseado na captura do istótipo IgG4, amplamente expresso, especialmente em pacientes microfilarêmicos assintomáticos (LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 2011).

O ensaio imunoenzimático CELISA (produzido por Cellabs Pty Ltd, Brookvale, NSW, Austrália) baseia-se em um ELISA indireto que detecta anticorpos IgG4 a partir do antígeno Bm14 (figura 6). Uma vantagem desse teste é a possibilidade de distinguir uma infecção ativa daqueles

indivíduos apenas expostos mas não infectados, além de ser usada à qualquer hora do dia em amostras de soro, plasma e sangue, inclusive seco no papel filtro (CHANDRASHEKAR et al., 1994; LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 2011). Porém, não é indicado para ser usado em áreas endêmicas da *Oncocerca volvulus*, pois existe reação cruzada (WEIL et al., 2011). Como Oncocercose e filariose linfática não coexistem nas mesmas regiões do Brasil, tal teste é também utilizado no SRNF/FIOCRUZ-PE, como um dos parâmetros para avaliar casos suspeitos de FL.

Figura 6 – Kit de diagnóstico CELISA test.



Fonte: de Souza, 2012.

A proteína WbSXP1 foi avaliada na forma de um ensaio anti-Wb-SXP-1 IgG4 ELISA, demonstrando uma sensibilidade de 100% na detecção de indivíduos bancroftianos, porém apresentou reação cruzada de 40% em infecções por *Loa Loa* (espécie helmíntica causadora da Loasis filarial) (RAO et al., 2000). Já em 2004, a WbSXP1 foi também usada no desenvolvimento de um kit pela técnica de imunofiltração, direcionada a anticorpos IgG anti filariais. Quando sua sensibilidade foi avaliada, obteve-se um percentual em torno de 90% nos indivíduos testados para infecções por *Brugia* e *W. Bancrofti* (BASKAR et al., 2004). Apesar dos avanços, até o momento nenhum ensaios de captura de anticorpo para a WbSXP-1 se encontra disponível comercialmente.

O *Brugia* Teste Rápido, do inglês *Brugia rapid dipstick test* (BR) (atualmente produzido por Reszon Diagnostics Int. Sdn), baseado na técnica de imunocromatografia, foi um outro teste desenvolvido para o diagnóstico da filariose linfática a partir do antígeno recombinante BmR1 oriundo da *B. malayi* (RAHMAH et al., 2001). Em uma avaliação realizada posteriormente, o teste apresentou uma sensibilidade e especificidade de 97% e 99% respectivamente, para detecção de anticorpos filariais IgG4 por *Brugia malayi*. Ensaio de ELISA utilizando o BmR1 também foram descritos, apresentando uma sensibilidade acima de 90% em pacientes infectados por ambas espécies de *B. malayi* e *B. timori* (LAMMIE et al., 2004).

O panLF rapid teste foi produzido em 2007 com o objetivo de detectar infecções por ambas espécies de *Brugia malayi* e *W. bancrofti*, utilizando os antígenos recombinantes BmR1 e BmSXP,

um antígeno de *Brugia malayi* ortólogo do WbSXP1. O teste tem por base também a técnica de imunocromatografia e é capaz de detectar anticorpos IgG4 filariais, porém oferece a desvantagem da possibilidade de reação cruzada para ambas espécies filariais, apesar de cada antígeno responder de forma mais sensível àquela espécie que está direcionada (RAHMAH et al., 2007). Com relação a sensibilidade e especificidade, em estudo realizado com pacientes microfilarêmicos oriundos da Sri Lanka, o panLF rapid apresentou um percentual de 96% e 100%, respectivamente, para infecções por *Brugia* e *Wuchereria*, porém destacou-se a necessidade de um estudo com um número maior de indivíduos para a validação do kit (NOORDIN et al., 2007). Mais recentemente, um trabalho testou amostras de diferentes classes, mostrando que o pnLF rapid test tem o potencial para monitorar a exposição à infecção filarial no PGEFL (MARY et al., 2011).

Além dos antígenos descritos acima, a proteína wb123 foi identificada em estágios larvais L3 de *W.bancrofti*, e se mostrou de forma promissora na captura de anticorpos anti-Wb123 IgG e IgG4 no diagnóstico da filariose linfática. Com isso, foi desenvolvido um sistema de imunoprecipitação Luciferase (LIPS) que apresentou sensibilidade e especificidade em torno de 100% em pacientes filarêmicos testados. Como vantagens apresenta a rapidez da realização, a utilização de uma quantidade mínima de soro por teste e potencial aplicação em monitoramentos do PGEFL, principalmente na identificação de pacientes em estágios iniciais de infecção, quando a microfilaremia não se mostra expressiva (KUBOFCIK; NUTMAN, 2012). Em seguida, foram desenvolvidos dois testes para a wb123, o ELISA e o da fita (*Strip*). Apesar da reação cruzada com *O. volvulus*, ambos mostraram-se ser sensíveis e viáveis para o monitoramento de infecção filarial recente (STEEL et al., 2013).

Por fim, um teste de ELISA indireto para capturar IgG4 a partir de antígenos somáticos de *B. malayi* foi desenvolvido. A novidade aqui é a possibilidade de visualização do resultado a olho nu além da análise pela densidade óptica (OD) no ELISA. Ambas metodologias apresentaram alta sensibilidade e especificidade, abrindo a possibilidade para outras formas de análise do diagnóstico da FL (WONGKAMCHAI et al., 2014).

- Pesquisa de Antígenos circulantes

O diagnóstico imunológico de captura de antígenos Circulantes Filariais (ACF), que pode ser entendido como o produto de secreções e excreções do nematódeo *W.bancrofti* em sua forma adulta, tem se mostrado bastante promissor ao longo dos anos, comercialmente representado pelos kits Og4C3-ELISA e Cartão ICT (MORE; COPEMAN, 1990; WEIL et al., 1997). Esses dois testes são os exames imunológicos indicados em casos suspeitos de FL e devem ser realizados no Serviço

de Referência Nacional em Filariose/ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife/PE (BRASIL, 2009).

O primeiro kit a ser desenvolvido foi o Og4C3-ELISA (Trop-Ag *W. bancrofti* ELISA kit, produzido pelo JCU Tropical Biotechnology Pty. LTDA, Townsville, Queensland, Austrália) (TropBio 1996). Este é baseado na técnica imunoenzimática ELISA, utilizando um anticorpo monoclonal Og4C3 de classe IgM, cuja etiologia vem do nematódeo bovino *Onchocerca gibsoni*. Surpreendentemente, o anticorpo reage com os antígenos filariais de *W.bancrofti* em amostras de soro ou plasma (figura 6) (MORE; COPEMAN, 1990).

Como vantagens, o ensaio Og4C3 pode ser útil em grandes demandas, executando até 80 diagnósticos por vez, além da conveniência de ser realizado a qualquer horário do dia. Em contrapartida, oferece um custo maior em comparação com os métodos parasitológicos. O tempo de realização dos exames e a necessidade de uma boa infra-estrutura laboratorial, também exemplificam as desvantagens do presente kit, principalmente na aplicação em inquéritos populacionais, por exemplo (BRASIL, 2009; ROCHA et al., 2000; SILVA et al., 2008).

Figura 7 – Kit EISA Og4C3.



Fonte: BRASIL, 2009.

O cartão ICT (ICT Diagnostic, Balgowlah, New South Wales, Austrália, atualmente BINAX), substituído pelo POC-ICT (WHO, 2016), de forma similar também utiliza um anticorpo monoclonal produzido a partir do extrato do verme *Dirofilaria immitis*, o AD12.1 da classe IgG. Este captura antígenos filariais de até 200KDa de tamanho, provenientes principalmente dos vermes adultos (figura 12) (WEIL et al., 1997). O ensaio foi desenvolvido pela necessidade de um diagnóstico mais prático, a baixo custo e que pudesse ser utilizado em programas de controle da

filariose linfática, uma vez que é uma técnica minimamente invasiva (ROCHA, 2004). Este pode ser feito a partir de soro, plasma, líquido hidrocelico ou sangue total, obtendo-se o resultado em 10 minutos (BRASIL, 2009).

Um novo kit de diagnóstico (The Alere Filariasis Test Strip), também baseado na captura de antígenos através do anticorpo monoclonal AD12, apresentou resultados mais satisfatórios em comparação ao cartão ICT. O teste de tira detectou 26,5% mais pessoas com antigenemia filarial do que o teste do cartão, mostrando melhor sensibilidade, estabilidade dos insumos e custo reduzido (WEIL et al., 2013).

Figura 8 – Cartão ICT. Em destaque resultado positivo.



Fonte: BRASIL, 2009.

Com relação à sensibilidade e especificidade dos testes Og4C3-ELISA e Cartão ICT são extremamente altas, em torno de 100% para ambos os parâmetros de avaliação, entretanto deixam a desejar quando a microfilaremia é ausente ou diminuta (LAMMIE et al., 1994; ROCHA et al., 2009). Um estudo recente realizado em escolas com crianças na faixa dos 4 a 15 anos, na RMR em Pernambuco, demonstrou a eficiência do cartão ICT em comparação com o parasitológico e o Og4C3-ELISA. Então, este foi relatado como diagnóstico de escolha para a identificação de indivíduos filarêmicos que ainda não iniciaram o tratamento em massa (MDA), devido a sua alta sensibilidade e facilidade de execução (OLIVEIRA et al., 2014).

Um dos problemas encontrado nos testes de captura de antígenos é a presença de uma antigenemia positiva prolongada, sendo evidenciada mesmo após expressivos tratamentos antifilariais. A persistência da antigenemia leva à dificuldades na identificação de pacientes com infecção ativa daqueles com infecção passada e de indivíduos não infectados porém expostos às larvas infectantes, mesmo que de forma esporádica ou contínua. Diante disto, a aplicação dessas técnicas nos serviços de monitoramento e controle da filariose linfática, se torna limitada, não sendo útil

para avaliar, por exemplo, o critério de cura de pacientes filarêmicos (FREEDMAN et al., 2001; SCHUETZ et al., 2000; WEIL; RAMZY, 2007).

Apesar dos testes Og4C3 e cartão ICT já estarem estabelecidos no mercado, o fato de ainda não existir um diagnóstico 100% eficaz, motiva várias pesquisas na área em busca de um melhor teste de captura de antígenos. Um trabalho pioneiro desenvolveu anticorpos policlonais contra as proteínas BmSXP-1 e WbSXP-1, mostrando serem competentes em reconhecer os antígenos nos soros de pacientes infectados com *B. malayi* e *W. bancrofti* (LALITHA et al., 2002).

Quanto à proteína WbSXP-1, esta foi utilizada em outros trabalhos para produção e avaliação também de anticorpos monoclonais (AcMo) (JANARDHAN et al., 2011; PANDEY et al., 2011; VISHAL et al., 2014). O primeiro relato de AcMo contra WbSXP-1 mostrou sucesso na identificação de pacientes com FL, mas reação cruzada para outros helmintos não foi testada (JANARDHAN et al., 2011). Em estudo subsequente, também houve produção de AcMo que detectou de forma eficiente a proteína nativa de microfilarias, a forma recombinante bem como soro de pacientes com FL (PANDEY et al., 2011).

Depois disso, estes AcMos foram testados em dois trabalhos diferentes. No primeiro, foi primeiro descrito o método da lâmina, que baseia-se na ressuspensão do sangue contido em uma lâmina de gota espessa para análise de captura de antígenos por ELISA (VISHAL et al., 2014). Essa metodologia é fácil, mais barata e menos invasiva do que a coleta do sangue venoso. Tais características são ideais para inquéritos epidemiológicos a fim de avaliar populações “livres” da doença, auxiliando o PGEFL (VISHAL et al., 2014). O segundo trabalho utilizou o AcMo contra a WbSXP-1 (PANDEY et al., 2011) em conjunto com outro produzido contra uma proteína de *B. malayi*, a BmVAH (*vespid allergen homologue*). Essa combinação apresentou melhor reconhecimento de pacientes infectados com os dois parasitas, do que quando os anticorpos foram usados de forma isolada (RAVISHANKARAN et al., 2014).

Em um outro estudo, AcMo produzidos contra a proteína proveniente da bainha microfilarial de *Brugia malayi* (Shp-1), reconheceram indivíduos infectados por *B. malayi* e *W. bancrofti* (JAWAHARLAL et al., 2014). Quando tais anticorpos foram comparados com os testes de captura de antígenos SXP-1 e Og4C3, todos detectaram MF de *W. bancrofti*, anticorpos contra a Shp-1 e SXP-1 reconheceram MF de Bm e apenas Shp-1 detectou endêmicos normais e pacientes crônicos. Esses resultados mostraram que este último teste é importante para o monitoramento do tratamento em massa, por ser capaz de identificar pacientes que entraram em contato com os parasitas, mas que não estão infectados no momento do teste (JAWAHARLAL et al., 2014).

Em seguida, RAVISHANKARAN e colaboradores, 2016 produziram anticorpos contra a proteína ALT-2 (Abundant Larval Transcript-2) de *B. malayi*, que foram capazes de reconhecer

57% dos indivíduos EN negativos para MF de uma área de alta infecção filarial. Segundo os autores, o teste descrito pode ser útil para a detecção de infecções filariais recém instaladas em regiões endêmicas de países afetados pela LF (RAVISHANKARAN et al., 2016).

2.6 TRATAMENTO

O tratamento da filariose linfática para portadores da infecção ativa, microfilarêmicos ou não, com ou sem a presença de vermes adultos, baseia-se na utilização principalmente da droga citrato de dietilcarbamazina (DEC) via oral. Independente da presença de sintomas clínicos, a OMS preconiza uma administração usual de 6mg/kg/dia durante 12 dias. Esse esquema terapêutico pode variar em casos de EPT, por exemplo, onde há um prolongamento da administração para 30 dias. A DEC apresenta uma forte ação microfilaricida nas primeiras horas de ingestão do medicamento, eliminando as microfíliarias rapidamente (DREYER & NORÕES, 2002). Mas também tem efeito macrofilaricida, ou seja, eliminando os vermes adultos, o que pode ser comprovado pelo desaparecimento da “dança das filarias” no exame de ultra sonografia (BRASIL, 2009). Com relação aos efeitos colaterais, estes são representados pelas dores no corpo, mal estar e sonolência, porém tendem a desaparecer espontaneamente (DREYER et al., 2002).

A DEC também é usada em pacientes com manifestações crônicas, mas em associação com fisioterapia e outros fármacos tópicos como antifúngicos ou antibióticos, pela possibilidade de co-infecção que pode causar o linfedema. Em outras situações clínicas como hidrocele e quilocele, a cirurgia pode ser indicada em casos graves. Contudo, é válido ressaltar que a educação sanitária aliada a políticas públicas nas áreas urbanas, referente à melhorias na qualidade de vida e saneamento básico, atuam de forma imprescindíveis, auxiliando no processo de erradicação dessa e de outras parasitoses, reduzindo por exemplo a transmissibilidade pelos mosquitos vetores (DREYER et al., 2002).

Ao longo dos anos, outros fármacos também foram inseridos como forma de controle, prevenção e tratamento, como a Ivermectina e o Albendazol. O primeiro pela ação de amplo espectro e microfilaricida, e o último pela ação em outras enteroparasitoses (muitas vezes associada à filariose devido às más condições socioeconômicas) e potencial agente eliminador dos vermes adultos filariais. O MDA, *mass drug administration* ou tratamento em massa, representa uma das estratégias adotadas pelo Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGELF), e atua de forma sistemática no combate à doença, utilizando os fármacos Ivermectina e Albendazol em associação com a DEC. Essa estratégia tem por objetivo intensificar a ação microfilaricida e ainda atuar contra outros helmintos (figura 9). O objetivo principal do PGEFL através do MDA é a

redução dos níveis de microfilaremia ao ponto de inviabilizar a transmissão, interrompendo assim o ciclo biológico entre o mosquito e o parasita (ICHIMORI, 2014).

Figura 9. Quadro explicativo do tratamento em massa para filariose linfática (do inglês, *Mass Drug Administration* MDA).

MDA - Mass Drug Administration (Tratamento em massa)		
Associação Terapêutica: • Albendazol + Ivermectina (áreas co-endêmicas com Onchocircose) • Albendazol + DEC (áreas endêmicas)	Dose única anual durante 5 anos	Tratamento para todos indivíduos em áreas endêmicas

Fonte: O autor (2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir antígenos recombinantes e anticorpos para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filariose Linfáticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar as proteínas alvo do trabalho;
- b) Clonar o gene, expressar e purificar os antígenos filariais recombinantes em células de bactéria;
- c) Imunizar os coelhos e camundongos, realizar a fusão, seleção de clones e caracterização dos hibridomas selecionados;
- d) Avaliar os antígenos rWb14, rWbT para aplicação em diagnóstico, utilizando painéis de soros de infectados com *W. bancrofti*.
- e) Caracterizar os anticorpos monoclonais e policlonais produzidos contra a rWb14.

4 ARTIGO 1 – Evaluation of the recombinant antigens Wb14 and WbT for the capture antibody diagnosis of lymphatic filariasis.

Wb14 and WbT ELISA for Filariasis.

André Filipe Pastor ^{*1,2,4}; Abraham Rocha ^{1,3,5} ; Marli Tenório ¹; Paula Melo ^{1,3}; Maria Rosângela Grilis ^{1,3}; Maressa Rhuama ^{1,2}; Antonio Mauro Rezende ¹; Osvaldo Pompilio de Melo Neto ^{1,2}; Ernesto Marques Jr. ¹; Rafael Dhalia ^{1,2}.

- 1- Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brazil .
- 2- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- 3- Serviço de Referência Nacional em Filarioses (SRNF), Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE.
- 4- Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, IFSertão-PE.
- 5- Hospital Otávio de Freitas, Recife, Pernambuco, Brazil.

[*andrefilipe.pastor@gmail.com](mailto:andrefilipe.pastor@gmail.com), +558121012500

Financial Support: FACEPE/APQ-0058-4.00/13.

ABSTRACT

BACKGROUND Lymphatic Filariasis (LF) is a parasitic disease caused mainly by the *Wuchereria bancrofti* worm and that affects up to 120 million people worldwide. LF is the second cause of chronic global deformity, responsible for 15 million people with lymphedema (elephantiasis) and 25 million men with scrotal hydrocele. Its diagnosis is still associated with numerous difficulties, such as the sample collection periods (microfilaria nocturnal periodicity) and limited diagnostic kits.

OBJECTIVES The aim of this work was to evaluate two recombinant antigens (Wb14 and WbT) as part of an ELISA based antibody capture tests for LF.

METHODS The recombinant antigens rWb14 and rWbT were expressed in *E. coli* BL21 and an antibody capture ELISA was performed. For this, sera were used from microfilaremic individuals with *W. bancrofti* (MF), chronic pathology (CP), individuals infected with *Strongyloides* (SP) and healthy controls from endemic (EN) and non-endemic (NE) areas.

FINDINGS Both tests showed similar results, with 90% sensitivity and 96.6% specificity. In comparison with the BM14 ELISA commercial test, the Wb14 and WbT antigens performed with identical sensitivity but greater specificity. Reduced positivity with the CP suggested a potential to monitor cure. This was not confirmed, however, when sera from individuals up to seven years after treatment were assayed.

MAIN CONCLUSIONS The Wb14 and WbT ELISAs were considered efficient and promising diagnostic tests. Due to the importance of antibody capture analysis to evaluate the global program to eliminate lymphatic filariasis (GPELF), the tests proposed here appear as great alternatives to the available commercial system.

Key words: Immunodiagnostic; *Wuchereria bancrofti*; ELISA; biotechnology.

INTRODUCTION

Lymphatic Filariasis (LF) is a parasitic disease caused by nematode worms belonging to the genera *Wuchereria* or *Brugia* and transmitted by a great number of mosquito species (WHO 2016). It affects over 100 million people worldwide and 90% of the reported cases are attributed to *W. bancrofti*. LF is the second cause of chronic global deformity, responsible for 15 million people with lymphedema (elephantiasis) and 25 million men with scrotal hydrocele (WHO 2010).

In 1993, the World Health Organization (WHO) listed LF as one of six potentially eradicable infectious diseases. Later, in 1997, the World Health Assembly (resolution 50.29) elected it as a potentially eradicable global public health problem. In response to this resolution, WHO launched in 2000 the Global Program for Elimination of Lymphatic Filariasis (GPELF), which aims to eliminate the disease until 2020 (WHO 2010). To evaluate the success of GPELF, it is essential to monitor the breakdown of LF transmission through diagnostic methods able to detect the disease with high sensitivity and specificity. These should be capable of rapidly identifying residual foci of infection that can be blocked to prevent the disease resurgence. WHO has thus implemented guidelines and protocols to map, monitor and evaluate the success of GPELF through appropriate laboratory tests (Ottesen 2000).

In 2000, when GPELF was created, the diagnostic methods for LF were limited to clinical examination, detection of antibodies against crude antigen preparations and visual detection of microfilaria from capillary and venous blood samples, the latter using the techniques of thick smear and membrane filtration, respectively. The thick smear approach has been used worldwide for several decades because it is a low cost technique that demands little infrastructure (Ramzy 2002). However, in areas where *W. bancrofti* is endemic and the periodicity of the microfilaria is nocturnal, this diagnostic approach faces difficulties due to the need for blood collection at late hours. A resistance by the targeted communities to blood collection might thus occur due to religious beliefs, violence or the inconvenience of the late night approach. In addition, this test may be unable to confirm infection in individuals with low microfilaria density or even temporarily amicrofilaremic, but nevertheless with the potential to contribute to future transmissions (Ximenes et al. 2014). An alternative immunodiagnostic method developed almost thirty years ago for LF diagnosis was the Og4C3 ELISA, based on the search for circulating filarial antigens (More & Copeman 1990). More recently, the point of care immunochromatographic AD12 card test was developed (POC-ICT) (Weil & Lammie 1997) and it has now been replaced by the Filariasis Test Strip (FTS) (WHO 2016). These methods have a greater sensitivity for microfilaria detection and blood samples can be collected at any time of the day (Weil & Lammie 1997, Rocha et al. 2009).

However, individuals can remain positive for many months after cure and the tests may still give a false negative result for samples with low microfilaria densities (Iqbal & Sher 2006). In addition, both microfilaria and circulating antigens appear only several months after infection, limiting the use of these tests to monitor the decrease in transmission intensity or even resurgence of LF in later stages after elimination (Damgaard et al. 2016).

To overcome the limitations of microfilaria and antigen capture tests, the screening for anti-filarial antibodies can be used as a marker of residual endemicity or the onset of a resurgence of transmission, functioning as a warning system in areas that have been subjected to LF eradication measures (Joseph et al. 2011). Tests have been developed based on the use of recombinant antigens to detect anti-filarial antibodies. Among those antigens, two of the best known are from *W. bancrofti*, WbSXP-1 (Rao et al. 2000) and Wb123 (Kubofcik et al. 2012) and one from *B. malayi*, Bm14 (Lammie et al. 2004). The latter gave rise to the most widely used antibody capture kit for LF diagnosis, the ELISA BM14 (CELISA) (Weil & Ramzy 2007, Weil et al. 2011, Nunes et al. 2016). However, cross-reactivity issues have been reported with the ELISA BM14 test (Weil et al. 2011) and the fact that the recombinant antigen is derived from *B. malawi*, instead of *W. bancrofti*, may lead to some false negative results. The present study aimed to solve these issues by evaluating two further recombinant antigens derived from *W. bancrofti*, Wb14 and WbT, against a panel of sera from patients afflicted with LF and controls and considering their use in an alternative antibody capture test for the diagnosis of the disease. Such test would be extremely useful to evaluate the success or failure of the GPELF in several endemic areas where control interventions have been taking place, especially considering that the lack, until recently, of efficient alternatives to the ELISA BM14 test have led to difficulties in its acquisition and use for large scale LF diagnosis, in Brazil at least.

METHODS

Ethical aspects.

This study was approved by the Research Ethics Committee from the Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE (CEP - 45085215.0.0000.5190).

Serum bank.

Aliquots from the 114 sera evaluated here were obtained from a bank of LF biological samples stored at -20°C and belonging to the Brazilian National Filariasis Referral Service, based at the Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) (Rocha et al. 2009). The participants (or their

parents in the case of minors) were given information about the research and were asked to read and sign the terms of consent.

Laboratorial assays for filarial investigation

Briefly, 10mL of venous blood were first split into two ~5 mL aliquots in the presence of EDTA. The first aliquot was used for the visualization and quantification of microfilaria after filtration while the serum from the second aliquot was used for serological assays. For the ELISA Og4C3 (TropBio®, JCU Tropical Biotechnology Pty Ltd, Townsville, Queensland, Australia) and POC-ICT (BinaxNOW, Binax, Inc., Maine, USA) tests, 100 µL of serum was placed in the position recommended for the test and a trained technician read the result precisely 10 minutes after loading. The visualization of the two lines (test and control) was interpreted as a positive result. For the anti-filarial Bm-14 (Filariasis CELISA, Cellabs Pty. LTd., Brookevale, Australia tests) test and the two ELISA based assays, anti-Wb14 and anti-WbT (SRNF-Protocol), all the procedures were developed according to the manufacturers' protocols, described elsewhere (More & Copeman 1990, Weil & Lammie 1997). Positive sera were defined as sera positive for all other previous tests evaluated (Bm14, Og4C3, POC-ICT and membrane filtration), while negative sera were also those having negative results for the same tests.

Design, chemical synthesis, cloning and expression of the Wb14 and WbT genes.

The amino acid sequence of the Wb14 protein found in the Broad Institute database was back-translated with the help of the Gene Designer 2.0 program. WbT is derived from the same Wb14 gene but removing the nucleotides encoding the 17 amino acids subsequent to the first methionine. Restriction sites for the KpnI and NheI enzymes were then added flanking the protein coding regions for both Wb14 and WbT antigens and the final nucleotide sequences ordered from GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen). The final gene products were then cloned into the KpnI/NheI sites from the pRSET-A expression vector (Invitrogen), a plasmid that adds a six histidine tag to N-terminus of the recombinant protein. Protein expression and purification were performed as described below. Briefly, to perform the large-scale induction of the rWb14 and rWbT proteins, 200 mL of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with the recombinant plasmids were grown in LB medium plus 50 mg/mL ampicillin up to an absorbance of 0.8. IPTG (1mM) was then added to the medium and growth was maintained for four more hours at 25°C. The cells were then harvested by centrifugation and resuspended in 20 mL of PBS, followed by lysis through sonication. The purification of rWb14 and rWbT was performed by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using nickel agarose beads (from Qiagen), capable of capturing the heterologous proteins

due to their affinity to the proteins' histidine tail, as recommended by the manufacturer. For confirmation of the recombinant proteins' expression, SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis was performed. A yield of roughly 500 µg of protein per batch of purification was obtained.

Antibody capture tests.

These were generally performed as previously described for similar antibody capture assays (Rao et al. 2000, Weil et al. 2011, Kubofcik et al. 2012) with some modifications. Briefly, a 96 wells microplate (Corning 3690, Costar, USA) was sensitized with 50 µL of the recombinant antigen at a concentration of 20 µg/mL in 0.1M Carbonate /Bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated for 18 hours at 4°C. Blocking was then performed with phosphate-buffered saline (PBS - pH 7.2) supplemented with 4% BSA, followed by five washes with PBS plus 0.05% Tween 20 (PBS / T). For the assays, 100 µL of serum diluted 1: 100 in PBS supplemented with 0.5% BSA were loaded per well, followed by incubation at 37°C for 1 hour. After a new set of washes 50 µL of HRP Mouse Anti- Human IgG4 (Zymed) diluted 1: 15,000 in PBS plus BSA was added to each well followed by another 1 hour incubation. Following a final set of washes, the BD OptEIATM TMB substrate (BD Biosciences, USA) was added and the plates incubated for 15 minutes at room temperature, with the reaction stopped with 50 µL of a 1N H₂SO₄ solution. The plates were read at 450 nm using the Benchmark Plus microplate spectrophotometer (BIORAD, USA) and the results were expressed in optical density (OD).

Statistical analysis

All graphs were made using the GraphPad prism software version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The mean absorbance values for each individual were used to calculate the IgG4 antibody response against Wb14 and WbT. The cutoff was determined as the mean absorbance value derived from the assays using the sera from the true negative (NE) group plus three fold the standard deviation. The sensitivity, specificity and the positive and negative predictive values were determined using the results from the true positive and true negative groups. In addition, a receiver-operating characteristic (ROC) curve was made to determine the accuracy of each test.

RESULTS

Expression of recombinant Wb14 and WbT.

In the present work, the recombinant Wb14 antigen from *W. bancrofti* was expressed in *Escherichia coli* with an N-terminal poly-histidine tag. At the same time, an artificially truncated form was created through the removal of the 17 residues localized immediately after its first methionine, generating a different recombinant antigen, the WbT. This was done because this region proved to be very hydrophobic, which could prevent an efficient expression of the antigen as well as its recognition by the human sera. After large scale induction and affinity chromatography the two recombinant polypeptides were ran on SDS-PAGE gels to monitor their integrity (figure 1). As expected according to their predicted sizes, the Wb14 band ran with an apparent molecular weight slightly larger than 17 kDa (~18 kDa) while the WbT polypeptides migrated with a size very similar to the 17 kDa molecular weight marker. The size observed for the recombinant Wb14 is smaller than the one observed for the previous report with the same protein (Pandiaraja et al. 2010a), however this may be due to differences in the subcloning strategy or even SDS-PAGE methods. No indication of degradation is seen for either protein.

Evaluation of Wb14 and WbT antigens for the diagnosis of FL.

To evaluate the potential use of the antigens produced here for the FL diagnosis, sera from different groups of individuals were evaluated for their ability to recognize both polypeptides through ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Five different groups were selected according to previous clinical and parasitological evaluations and classified into distinct profiles: microfilaremic individuals (MF; n = 30); chronic pathology (CP; n = 26); individuals positive for *Strongyloides* sp. and other intestinal parasites (SP; n = 13); healthy individuals from the endemic region (EN; n = 15); healthy controls from non-endemic regions (NE; n = 30). For these assays the microfilaremic group was considered true positive and the non-endemic group as true negative.

The ELISA results for the two antigens with the various groups are summarized in figure 2A, 2B and table 1. Wb14 is efficiently recognized by most sera from the true positive microfilaremic group with 90% of the sera (27/30) producing a positive result. In contrast, for the second group with chronic pathology only 19.2% of the sera were positive (5/26). For those sera from individuals with *Strongyloides*/intestinal parasites a similar result was observed with a 23% positive result (3/13), but two of those positive sera produced very high absorbance values, suggesting a cross-reactivity. Likewise, the first group of negative sera, from the endemic region, also had a 20% positivity result (3/15), but here the absorbance values for the positive sera were low. In contrast, for the true negative group from the non-endemic region, only 1 out of 30 sera (3.3%) was positive in the assay, even then with a very low absorbance, just above the cutoff.

The ELISA using the WbT antigen produced results very similar to those from Wb14 but in general with lower absorbance values and cutoff, compatible with the fact that WbT is a truncated form of Wb14 (figure 2B). Minor differences were observed for the *Strongyloides*/intestinal parasites and the healthy control group from endemic areas where a slight increase in positivity was observed for WbT (also summarized in table 1). For those groups, however, the same sera that produced the highest absorbance values with the Wb14 antigens were also the same that led to higher absorbance with WbT. Overall performance by both antigens was then evaluated through a ROC curve analysis. For the Wb14 ELISA, it revealed a 98.11% accuracy for the test ($p < 0.0001$), with a very good performance (figure 2C). For the WbT ELISA its performance was even better with a 98.67% ($p < 0.0001$) accuracy result (figure 2D).

Monitoring anti-Wb14 and anti-WbT antibodies after DEC treatment.

The “chronic pathology” group evaluated in the figure 2 presumably includes individuals who were exposed to the filarial parasite, might have been infected, but were treated and/or cured of the disease a substantial amount of time before the serum samples were collected. The differences in positivity observed when the results from the microfilaremic individuals (90%), with active filariasis, are compared with those from this group (19.2%) then might indicate that the ELISA using either Wb14 and WbT could be considered as a test to monitor cure of the disease. To evaluate this possibility, the availability of serial serum samples from the same microfilaremic individual taken at specific periods after Diethylcarbamazine (DEC) treatment and cure was considered. Serum samples from five randomly selected individuals collected one, two, three, four and seven years after treatment were thus evaluated with the Wb14 and WbT ELISA tests and compared with sera collected prior to treatment. The results, summarized in figure 3, indicate that the tests failed to establish a relationship between cure and negativity, although a clear decay in absorbance levels was observed for all five sets of sera with both antigens. For the Wb14 antigen (figure 3A), the absorbance values for three individuals were below the cutoff after four years of treatment, but one of these had low absorbance values, below the cutoff even in the pre-treatment sample. The other two individuals were clearly positive in all samples, despite a trend for the reduction in absorbance values with time. A similar observation was done with the WbT antigen (figure 3B). Despite a decay in absorbance values after seven years for all five individuals, none of them fell below the cutoff, and were all considered positive by the test. Nevertheless, a more uniform reduction in absorbance values is observed with time for the five individuals using this antigen and it is possible that, in samples older than 7 years, all five individuals would produce negative results with this test.

Comparison of the Wb14 and WbT ELISA with tests commonly used for the diagnosis of lymphatic filariasis.

To compare the performance of the ELISA tests proposed here with current tests used for the diagnosis of lymphatic filariasis, the same sera groups assayed in figure 2 were also tested with four assays commonly used to diagnose the disease: BM14, the reference antibody capture test, more comparable to the assays performed here with Wb14 and WbT; Og4C3, a reference quantitative antigen capture test; POC-ICT, used as qualitative antigen capture test; and polycarbonate membrane filtration, the reference for the parasitological test. In comparison with the CELISA BM14 assay (Table 1), the tests described here were equivalent in sensitivity (90% for all three assays) but with a much higher specificity (96.6% for both Wb14 and WbT tests with 70% for the CELISA BM14). This was due to the fact that nine sera from the true negative group reacted with the BM14 assay while only one gave a positive result with either Wb14 or WbT. A significantly higher number of positive sera from individuals with chronic pathology were also seen for BM14 (61.5% versus 19.2% for both Wb14 and WbT). In contrast the three ELISA tests performed very similar with the other two groups assayed, with minimal differences in the number of positive samples from the patients with *Strongyloides*/intestinal parasites or the negative control individuals from the endemic area. The antigen capture tests (Og4C3 and POC-ICT) displayed sensitivities similar to the three, ELISA based, antibody capture assays, but 100% specificity when the microfilaremic group was compared with the sera from non-endemic healthy individuals, since no non-endemic serum was positive. As expected, the polycarbonate membrane filtration test produced the best results, with 100% sensitivity and specificity and no false positive nor false negative results.

DISCUSSION

Prior to the advent of molecular biology, the antibody capture tests for the diagnosis of lymphatic filariasis were based on the crude preparations of protein extracts from the worms that caused the diseases (Almond & Parkhouse 1986, Maizels et al. 1987). These tests were difficult to perform due to the laborious preparation of the extracts and their performance was affected by the high number of false positive results, due to cross reactions resulting from the presence of the many proteins and other components found in those extracts. Recombinant antigens then appeared as a promising alternative for the development of an antibody capture, ELISA based method, to diagnose LF, the most important being Bm33 (Dissanayake et al. 1993), Bm14 (Chandrashekar et al. 1994), WbSXP-1 (Rao et al. 2000) and Wb123 (Kubofcik et al. 2012). The current manuscript

evaluates the Wb14 antigen, and its WbT variant, as an alternative target for ELISA based, antibody capture test to be used for the point of care diagnosis of lymphatic filariasis. Wb14 is related to WbSXP-1 and both belong to a family of nematode proteins identified as potent immunogens in many parasite infections (Rao 2000) but their functions have not yet been determined.

Wb14 is a naturally truncated form of the WbSXP-1 protein from *W. bancrofti* with a stop codon at the nucleotide position 460 of its protein coding sequence. Wb14 is 153 amino acids long, while WbSXP-1 has an additional C-terminal extension of 29 amino acid residues. The two proteins share a 98% sequence similarity at the nucleotide level and both are homologous to equivalent SXP genes from related parasites, such as *B. malayi* (Bm14 and SXP-1), *Onchocerca volvulus* (Ov17) and *Ascaris suum* (As14) (Pandiaraja et al. 2010a). The results described here confirm that ELISA assays based on Wb14 and on its WbT variant perform with similar sensitivity and greater specificity for *W. bancrofti* than the well-established BM14 CELISA test (Weil & Ramzy 2007, Weil et al. 2011, Nunes et al. 2016). The Bm14 antigen was originally assayed with sera from individuals with LF from regions of India and Egypt, with 90% of the sera reactive against this antigen and cross-reactions seen only with *Onchocerca volvulus* (Chandrashekar et al. 1994). Later similar results were obtained with sera from various origins, when the sensitivity of the Bm14 ELISA was 91% for *W. bancrofti* and 96% for *B. malayi*, with cross reaction with *O. volvulus* and *Loa loa* infected sera (Lammie et al. 2004). Yet another study evaluated the CELISA Bm14 test, in which 91% of samples from *Brugia* and 98% from *W. bancrofti* were recognized, although a small cross-reaction with individuals infected with *Strongyloides* and *Ascaris* was observed, while the non-endemic group was not recognized (Weil et al. 2011). Another antigen early on proposed to be used for the diagnosis of lymphatic filariasis was Bm33, recognized by only 71% of the sera from individuals infected with *W. bancrofti* when it was first described (Dissanayake et al. 1993). A subsequent study using this antigen, however, confirmed that it could clearly discriminate between microfilaremic individuals and the non-endemic control group, although significant reactions were observed with the individuals with chronic pathology, in contrast to what was observed here (Krishna et al. 2009). More recently, the Wb123 antigen from *W. bancrofti* L3 larvae was proposed as a good choice for the analysis of newly infected persons with a subsequent rapid anti-Wb123 antibody capture test developed to identify individuals who came into contact with the *W. bancrofti* L3. These tests recognized 91.5% of the sera infected with *W. bancrofti* and showed some cross reaction with *O. volvulus* sera, but not with *Loa loa* nor with subjects with *Strongyloides* (Steel et al. 2013).

Both Wb14 and WbSXP-1 have been previously evaluated for the LF diagnosis, with very similar results regarding the recognition of total human IgG in sera from microfilaremic individuals (Pandiaraja et al. 2010a). WbSXP-1 was first evaluated for its potential to diagnose lymphatic filariasis through an IgG4 antibody capture ELISA, in assays displaying a 91-100% sensitivity for sera from individuals infected with *W. bancrofti*, with a lower performance for *B. malayi*. Sera from chronic, endemic and non-endemic samples were not recognized, but cross reaction was reported with samples derived from *O. volvulus* and *Loa loa* infections (Rao et al. 2000, Baskar et al. 2004, Lammie et al. 2004, Janardhan et al. 2011). Subsequently, a study was conducted that tested both WbSXP-1 and Wb14 against only five human serum samples in the ELISA, all with previously confirmed diagnosis and hydrocele. The two proteins showed similar reactivity against serum human IgG, especially from microfilaremic individuals (Pandiaraja et al. 2010a). At the same time, four synthetic peptides derived from WbSXP-1 showed significant potential as part of an antibody capture test. The one peptide with the lowest absorbance values in microfilaremic samples was located within the 29 amino acids segment that differs between Wb14 and WbXSP-1 (Pandiaraja et al. 2010b).

The present work can be justified by the absence of further followups to the previous study describing the Wb14 antigen and evaluating the human IgG response against this antigen with only five samples (Pandiaraja et al. 2010a). Here, the number of positive sera evaluated is significantly increased, to 30 microfilaremic individuals, and the results are more robust. When compared with Wb14, WbSXP-1 has the potential to be less-cross reactive since the 29 amino acids from the WbSXP-1 C-terminus missing from Wb14 has homology to equivalent sequences from many pathogens, including some species of *Plasmodium* and *Leishmania infantum* (Pandiaraja et al. 2010a). WbT is proposed as yet another new alternative for the diagnosis of lymphatic filariasis, since the three peptides that showed the best results in the previous recognition of filaremic individuals by WSXP-1 (Pandiaraja et al. 2010b) are present in the region common to WbT and the removal of the first 17 hydrophobic amino acids from Wb14 may facilitate its expression as well as recognition by the antibodies. The results shown here indicate that the anti-Wb14 and anti-WbT ELISAs may be more effective in evaluating active infections in adults. These tests also appear to be a better alternative to identify recent infections in children, since antibodies are rapidly produced in newly infected individuals (Lammie et al. 2004, Weil & Ramzy 2007, Weil et al. 2011, Hamlin et al. 2012). Regarding the permanence of positivity after treatment, there is a real difficulty in differentiating between active and past infection in antibody capture tests, since chronic patients titers remain for a long time (Damgaard et al. 2016). This has been reported with the BM14 based

test, which detected as positive 16 of the 26 individuals in the chronic pathology group. Of the 16 positives, 12/14 were hydrocele carriers, while only 4/12 had lymphedema. However, in addition to the higher hydrocele ratio, these individuals who remained positive lived in regions of high-transmission for lymphatic filariasis (De Souza et al. 2015), which may allow reinfection (Terhell et al. 2003). Although few chronic individuals were recognized as positive in the Wb14 and WbT ELISAs, both tests developed here were unable to predict cure in samples of *W. bancrofti* infected after seven years of DEC treatment and these discrepancies will have to be investigated further. It is possible that, at least for the two individuals that experienced an increase in antibody after the expected decline, this may be the result of reinfection or recovery of resident adult worms following DEC treatment, as described by Terhell et al. (2003). Nevertheless, antibodies against the Wb123 antigen failed to define negativity in samples from two Guyana-infected individuals, even after 17 years of treatment and without returning to an endemic *W. bancrofti* area during that period (Kubofcik et al. 2012).

In summary, our results indicate that the anti-Wb14 and anti-WbT ELISA assays displayed similar sensitivity and specificity to the Og4C3 and POC-ICT tests and better specificity than the commercial antibody capture kit, BM14. Despite these promising results with the Brazilian sera, both will need to be tested with samples from other filarial and related parasitic worms, such as *O. volvulus*, *Loa loa*, *B. malayi* and *B. timori*, so that in the future they may be considered a viable alternative to be used in other countries endemic for lymphatic filariasis.

Acknowledgment: We are thankful for the technicians who collected and prepared the sera and the Brazilian National Filariasis Referral Service (SRNF) for providing the samples of the study.

Financial support: The study was co-funded by FACEPE (APQ-0058-4.00/13) and FIOCRUZ-PE.

Conflicts of interest: There are no conflicts of interest in this work.

CO-AUTHOR CONTACT INFORMATION AND CONTRIBUTION

Abraham Rocha (1, 3, 5)	rocha@cpqam.fiocruz.br	Supervisor/ Participation in scientific meetings
André Filipe Pastor (1, 2, 4)	andrefilipe.pastor@gmail.com	Laboratory work (PhD project)/ Participation in scientific meetings
Antonio Mauro Rezende	antonimauro@gmail.com	Participation in scientific

(1)		meetings
Ernesto Marques Jr (1)	emarques@cpqam.fiocruz.br	Participation in scientific meetings
Maressa Rhuama (1, 2)	maressars@hotmail.com	Laboratory work (undergraduate student)/ Participation in scientific meetings
Maria Rosângela Grilis (1, 3)	rosangela@cpqam.fiocruz.br	SRNF technician
Marli Tenório (1)	marli@cpqam.fiocruz.br	Participation in scientific meetings
Osvaldo Pompílio de Melo Neto (1,2)	opmn@cpqam.fiocruz.br	Supervisor/ Participation in scientific meetings
Paula Melo (1, 3)	pfalcantara@cpqam.fiocruz.br	SRNF technician
Rafael Dhalia (1, 2)	rdhalia@cpqam.fiocruz.br	Supervisor/ Participation in scientific meetings

- 1- Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brazil .
Avenida Professor Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, Recife - PE, CEP 50.670-420, Caixa Postal 7.472.
- 2- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50.670-901.
- 3- Serviço de Referência Nacional em Filarioses, Instituto Aggeu Magalhães (SRNF), FIOCRUZ-PE, Brazil. Avenida Professor Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, Recife - PE, CEP 50.670-420, Caixa Postal 7.472.
- 4- Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, IF Sertão-PE.
Rua Projetada, S/N - Caetano II, Floresta - PE, CEP: 56.400-000, Brazil.
- 5- Hospital Otávio de Freitas, Recife, Pernambuco, Brazil.
Rua Aprígio Guimarães, S/n - Tejipio, Recife - PE, CEP: 50.920-640.

REFERENCES

Almond NM, Parkhouse RM. The Ig distribution of anti-phosphorycholine responses in mice infected with parasitic nematodes. Immunology. 1986; 59(4): 633–635.

Baskar LKV, Srikanth TR, Suba S, Mody HC, Desai PK, Kaliraj P. Development and evaluation of a rapid flow-through immuno filtration test using recombinant filarial antigen for diagnosis of brugian and bancroftian filariasis. *Microbiol Immunol*. 2004; 48(7): 519–25.

Chandrashekar R, Curtis KC, Ramzy RM, Liftis F, Li BW, Weil GJ. Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 64(2): 261–271.

Damgaard J, Meyrowitsch DW, Rwegoshora RT, Magesa SM, Mukoko DA, Simonsen PE. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. *Acta Trop*. 2016; 161: 26–32.

De Souza PFA, da Silva ECBF, Aguiar-Santos AM, De Medeiros ZM, Da Silva RLF, Oliveira PA, et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Atendidos No Ambulatório Do Serviço De Referência Nacional Em Filarioses Do Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-Pe. *Rev Patol Trop*. 2015; 43(4): 427–435.

Dissanayake S, Xu M, Nkenfou C, Piessens WF. Molecular cloning and serological characterization of a *Brugia malayi* pepsin inhibitor homolog. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 62(1): 143–146.

Hamlin KL, Moss DM, Priest JW, Roberts J, Kubofcik J, Gass K, et al. Longitudinal Monitoring of the Development of Antifilarial Antibodies and Acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a Highly Endemic Area of Haiti. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(12): 1–11.

Iqbal J, Sher A. Determination of the prevalence of lymphatic filariasis among migrant workers in Kuwait by detecting filarial antigen. *J Med Microbiol*. 2006; 55(4): 401–5.

Janardhan S, Pandiaraja P, Pandey V, Karande A, Kaliraj P. Development and characterization of monoclonal antibodies against WbSXP-1 for the detection of circulating filarial antigens. *J Helminthol*. 2011; 85(1): 1–6.

Joseph H, Maiava F, Naseri T, Silva U, Lammie P, Melrose W. Epidemiological assessment of continuing transmission of lymphatic filariasis in Samoa. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105(8): 567–78.

Krushna NSA, Shiny C, Dharanya S, Sindhu A, Aishwarya S, Narayanan RB. Immunolocalization and serum antibody responses to *Brugia malayi* pepsin inhibitor homolog (Bm-33). *Microbiol Immunol*. 2009; 53(3): 173–183.

Kubofcik J, Fink DL, Nutman TB. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012, 6(12): e1930.

Lammie PJ, Weil G, Noordin R, Kaliraj P, Steel C, Goodman D, et al. Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. *Filaria J*. 2004; 3(1): 9.

Maizels, RM, Burke J, Denham DA. Phosphorylcholine bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis in somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Parasite Immunol*. 1987; 9(1): 49–66.

More SJ, Copeman DB. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol*. 1990; 41(4): 403–406.

Nunes LV, Rocha A, Araújo J, Braga C, Alcantara P, Fiorillo K, et al. Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2016; 6(7): 521–526.

Ottesen EA. Editorial: The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. *Trop Med Int Health*. 2000; 5(9): 591–594.

Pandiaraja P, Murugan V, Hoti SL, Kaliraj P. Molecular characterization of a truncated antigen (Wb14) of SXP-1 of *Wuchereria bancrofti* from four endemic regions in India. *Exp Parasitol*. 2010; 125(3): 236–243.a

Pandiaraja P, Arunkumar C, Hoti SL, Rao DN, Kaliraj P. Evaluation of synthetic peptides of WbSXP-1 for the diagnosis of human lymphatic filariasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(4): 410–415.b

Ramzy RMR. Diagnosis Recent advances in molecular diagnostic filariasis and their use in epidemiological for human lymphatic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(1): 225–229.

Rao KVN, Eswaran M, Ravi V, Gnanasekhar B, Narayanan RB, Kaliraj P, et al. The *Wuchereria bancrofti* orthologue of *Brugia malayi* SXP1 and the diagnosis of bancroftian filariasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 107(1): 71–80.

Rocha A, Braga C, Belém M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P, et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(4): 621–625.

Steel C, Golden A, Kubofcik J, LaRue N, De los Santos T, Domingo GJ, et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(8): 1155–1161.

Terhell AJ, Haarbrink M, Van Den Biggelaar A, Mangali A, Sartono E, Yazdanbakhsh M. Long-term follow-up of treatment with diethylcarbamazine on anti-filarial IgG4: Dosage, compliance, and differential patterns in adults and children. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(1): 33–39.

Weil GJ, Lammie PJ. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitol Today.* 1997; 13(10): 401–4.

Weil GJ, Ramzy RMR. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. *Trends Parasitol.* 2007; 23(2): 78–82.

Weil GJ, Curtis KC, Fischer PU, Won KY, Lammie PJ, Joseph H, et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. *Acta Trop.* 2011; 120(1): S19–S22.

Ximenes C, Brandão E, Oliveira P, Rocha A, Rego T, Medeiros R et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(8): 978–983.

World Health Organization. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Progress Report 2000-2009 and Strategic Plan 2010-2020. WHO library. 2010; 1–93.

World Health Organization. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. Wkly Epidemiol Rec. 2016; 91(39): 441–460.

FIGURES

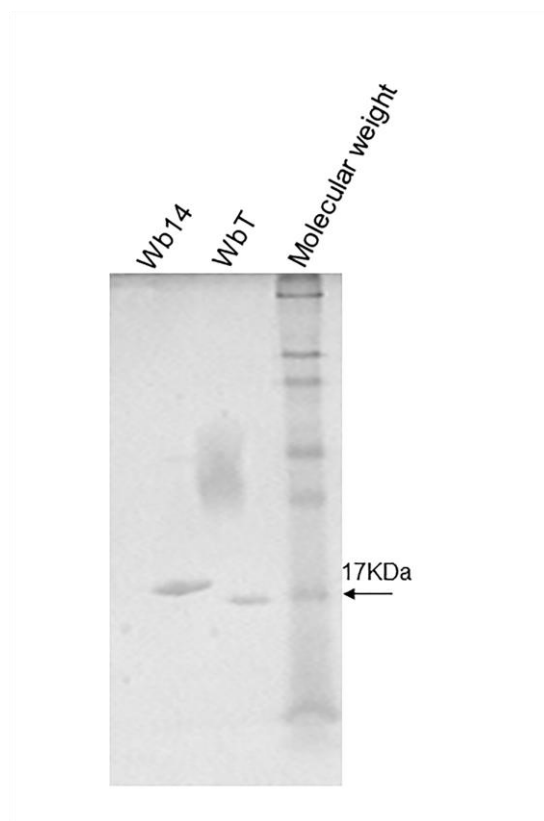


Figure 1. Polyacrilamide gel electrophoresis evaluating the affinity purified Wb14 and WbT recombinant polypeptides. His-tagged, recombinant Wb14 and WbT were ran on standard 12% SDS-PAGE gels stained with Coomassie Blue. Prestained molecular weight markers are shown on the right (7-175 kDa) with the 17 kDa band indicated by the arrow. The smear seen in the WbT lane is an artifact introduced inadvertently during the figure preparation.

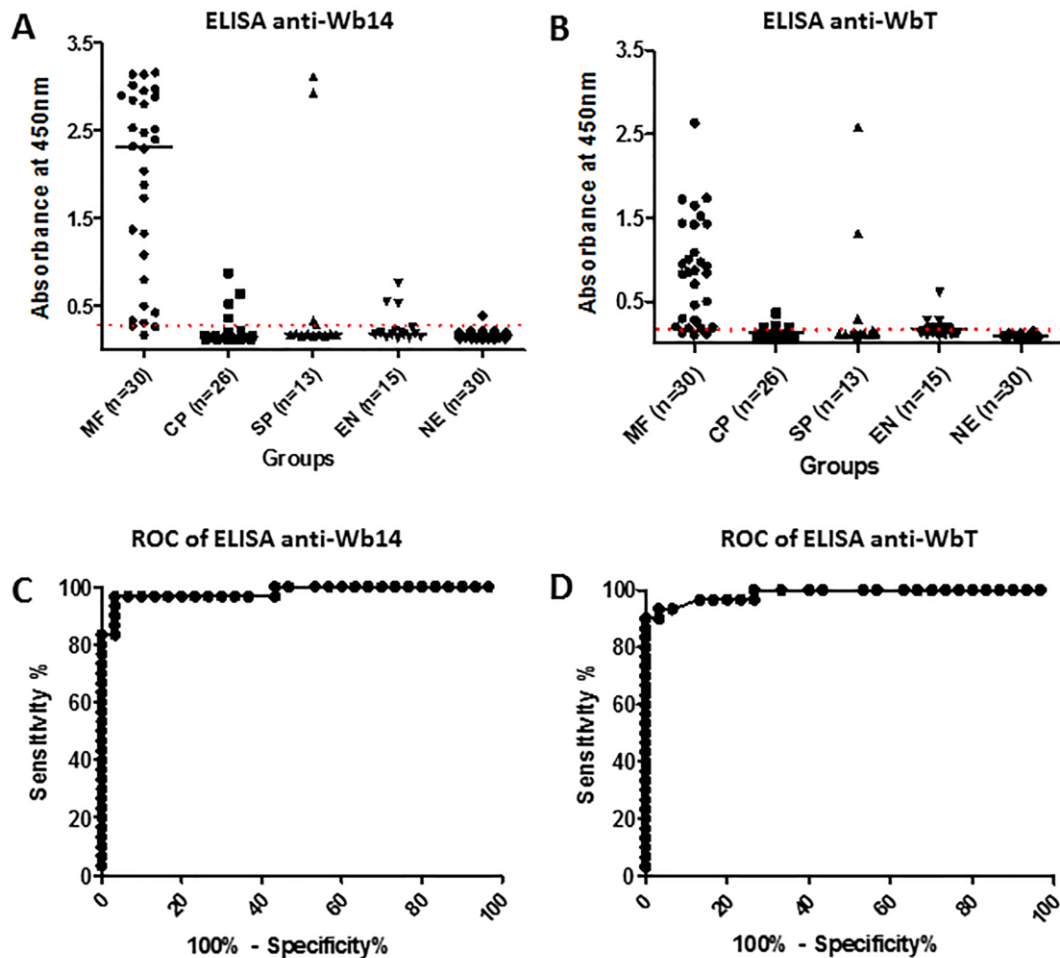


Figure 2. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) evaluating the recognition of the two recombinant proteins by different groups of FL related sera. (A) and (B) Summary of the ELISA results for the Wb14 and WbT polypeptides, respectively. Each point represents a different serum within the various groups evaluated: MF- microfilaremic individuals; CP- chronic patients; SP- *Strongyloides* positives; EN – endemic normal; NE- non endemic. The cutoff is represented by dashed lines: 0.37 for Wb14 ELISA and 0.14 for the WbT ELISA. (C) ROC curve evaluating the performance of the Wb14 and WbT antigens. The area under the curve was 0.9811 (98.11% accuracy) and 0.9867 (98.67%) for the two antigens, respectively, with a standard deviation of 0.01575 and 0.01085, and a confidence interval of 0.9502 to 1.012 and 0.9654 to 1.008. The p-value was <0.0001 for both.

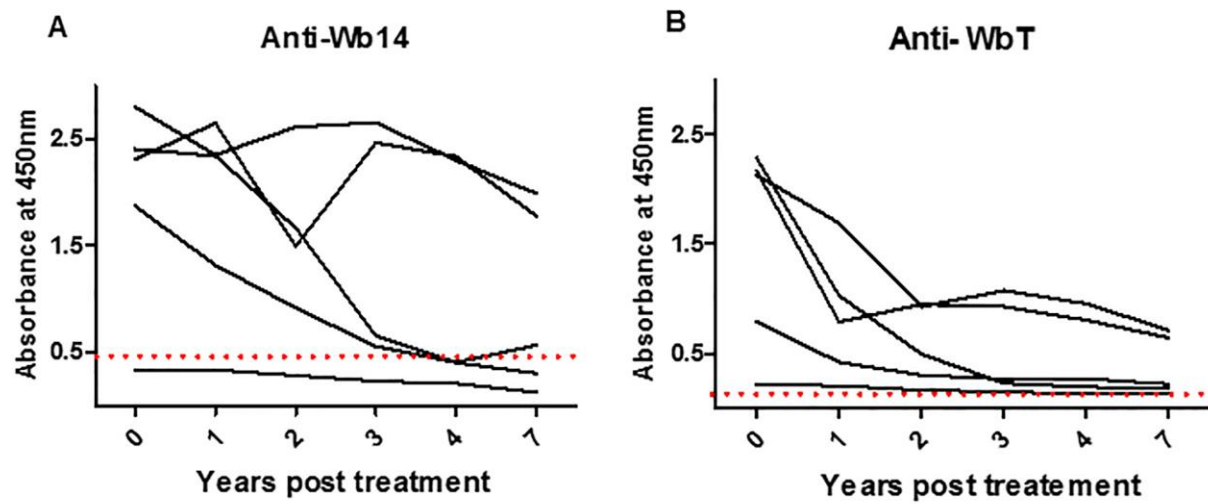


Figure 3. Evaluation of the antibody titer against the Wb14 and WbT recombinant antigens at different time periods after DEC treatment. The same five individuals were tested for both antigens before treatment with DEC and at several time points thereafter (1, 2, 3, 4 and 7 years). The cutoff is represented by the dashed line.

TABLE

Table 1. Summary of the data from the various tests performed in order to compare their performance for the diagnosis of lymphatic filariasis. The numbers of positive sera are shown for each group and test, as well as the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) derived from the data based on the comparison between the microfilaremic (MF) and non-endemic (NE) groups. The others groups are: CP- chronic patients; SP- *Strongyloides* positives; EN – endemic normal.

Tests Groups	Wb14 ELISA	WbT ELISA	Bm14 ELISA	Og4C3	POC- ICT	Filtration
MF	27/30	27/30	27/30	28/30	27/30	30/30
CP	5/26	5/26	16/26	0/26	1/26	0/26
SP	3/13	4/13	3/13	1/13	1/13	0/13
EN	3/15	5/15	4/15	0/15	0/15	0/15
NE	1/30	1/30	9/30	0/30	0/30	0/30
Sensitivity (%)	90%	90%	90%	93.33%	90%	100%
Specificity (%)	96.6%	96.6%	70%	100%	100%	100%
PPV (%)	96.4%	96.4%	75%	100%	100%	100%
NPV (%)	90.6%	90.6%	87.5%	93.7%	90.9%	100%

5 ARTIGO 2 - Development and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against Wb14 for the detection of circulating filarial antigens.

Pastor, A.F.^{1,2,4}; Rocha, A.^{*1,3}; Tenório, M.¹; Rhuama, M.^{1,2}; Alcantara, P.^{1,3}; Grilis, R.^{1,3}; Melo, K.¹; Rezende, A.¹; Pompilio, O.^{1,2}; Marques, E.¹; Dhalia, R.^{1,2}.

1- Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ-PE.

2- Federal University of Pernambuco, UFPE.

3- National Filariasis Referral Service, Parasitology Department, Aggeu Magalhães, Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ-PE.

4- Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano, IFSertão-PE.

*rocha@cpqam.fiocruz.br, +558121012500

Lymphatic filariasis (LF) is an endemic disease in tropical/subtropical regions of the world and *Wuchereria bancrofti* (Wb) is its etiological agent in Brazil. Human transmission occurs during blood feeding of *Culex quinquefasciatus* female vector. Infection is difficult to control due to highly adapted population of vectors, lack of sanitary barriers and neglected/inaccurate diagnosis. Available POC-ICT and Og4C3 ELISA capture monoclonal antibodies based on commercially kits, used to detect LF, are mostly worldwide used despite the fact that are raised to detect different Wb-related species. Both kits have reproducibility issues, are considered expensive as gold standard and are not produced in our country. At this scenario, the main goal of this study is to develop and evaluate monoclonal and polyclonal antibodies against rWb14 for the detection of circulating filarial antigens. We intend to provide diagnosis alternatives that can contribute to the GPETF and also evaluate efficiently the MDA program in Brazil and worldwide. The monoclonal antibodies 1H10, 3C8 and 6D2 are of class IgG1, and with polyclonal produced in rabbit develop a capture assay based in a sandwich ELISA the better combinations were using polyclonal as capture and 1H10 monoclonal as detection. The Wb14 antigen capture sandwich ELISA developed in this work proved to be a viable option for LF diagnosis, since it detected a similar amount of recombinant protein (15ng) in a study that developed a test capable of recognizing 100% MF individuals. After antibodies purifications, the perspective is analyzing with samples of MF, CP, EN, NE and *Strongiloides* infected individuals. These results will confirm whether this test could be used to assist the GPETF.

Key words: *Wuchereria bancrofti*, antibodies, Immunodiagnostic; ELISA; biotechnology.

1. Introduction

Lymphatic filariasis (LF) is a neglected disease caused by three species of worms: *Brugia malayi*, *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti*. There are 120 million infected people around the world and 90% of the reported cases has been attributed to *W. bancrofti* specie, the only filarial parasite found in Brazil (BRASIL, 2009; OTTESEN, 2000). This infection, which is transmitted by various mosquito species, mainly *Culex quinquefasciatus*, can lead to long-term physical injury, and is related with a high degree of social stigma and economic impact. LF is the second cause of chronic disability worldwide, including 15 million people with lymphoedema (elephantiasis) and 25 million men with urogenital swelling, especially scrotal hydrocele (WHO, 2016).

In 2000, was created the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) by the World Health Organization (WHO) (ADDISS et al., 2005). This Program, as its name implies, intend to eliminate the disease until 2020 by the Mass Drug Administration (MDA). The MDA consists in treating people who live in an endemic area with a combination of albendazole plus either ivermectin or diethylcarbamazine therapies (OTTESEN, 2000). According to WHO, during 2011, 736.9 million people were targeted by the program to receive MDA, but 538.6 million people were treated, being 73% of coverage (WHO, 2012).

The traditional and low cost diagnosis to monitoring LF is the thick blood examination, but it is known to be inconvenient and insensitive (ROCHA et al., 2009). Then, WHO indicates the detection of adult-specific circulating filarial antigen (CFA) by use the “point of care” imunocromatografico-AD12 card test” (POC-ICT) (BinaxNOW, Binax, Inc., Maine, USA) (WEIL et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2014) and ELISA Og4C3, as an auxiliary tool (MORE; COPEMAN, 1990). AD12-ICT has now been replaced by the Filariasis Test Strip (FTS) (WHO, 2016). Besides, they can be carried out using blood samples collected at any time of day. However, the lack of stability and specificity, high cost, time consumption and inability to detect infection prior to the development of adult parasites are problems to be solved (STEEL et al., 2013; RAVISHANKARAN et al., 2014).

Up to date, several works have been published showing new tools to capture CFA. Filarial recombinants antigens were used as targets to develop antigen capture assays, especially BmSXP-1, WbSXP-1 (LALITHA et al., 2002; JANARDHAN, et al. 2011; RAVISHANKARAN et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016); BmVAH (Vishal, et al., 2014), WbShp-1 (JAWAHARLAL et al., 2014) and *Brugia malayi* Abundant Larval Transcript-2 (ALT-2) (RAVISHANKARAN et al., 2016) are examples of proteins used to produce monoclonal antibodies to collect the CFAs LF patients.

In the present study, the recombinant Wb14 from *W. bancrofti* were used, a naturally truncated form of the WbSXP-1 protein with a stop codon at the nucleotide position 460 of the gene. It has 98% nucleotide sequence homology to WbSXP-1 and various levels of homology with SXP genes from other parasites, such as *B. malayi* SXP-1, Bm14, *Onchocerca volvulus* Ov17 and *Ascaris suum* As14 (PANDIARAJA et al., 2010). The Wb14 and WbSXP-1 functions have not yet been determined, but are known to belong to a family of nematode proteins identified as potent immunogens in many parasite infections (RAO et al., 2000). Both have already been evaluated for the LF diagnosis, with very similar results regarding the recognition of total human IgG in MF individuals (PANDIARAJA et al., 2010). The potential of WbSXP-1 as a target for the diagnosis of LF (LALITHA et al., 2002; JANARDHAN et al., 2011; RAVISHANKARAN et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016) as well as the promising results of wb14 for antibody capture (PASTOR et al., 2018) justify using Wb14 as a target for the development of an antigen capture assay.

This study aims to develop and evaluate monoclonal and polyclonal antibodies against rWb14 for the detection of circulating filarial antigens. We intend to provide diagnosis alternatives that can contribute to the GPELF and also evaluate efficiently the MDA program in Brazil and worldwide.

2. Methods

2.1. Ethical statement

Animal protocols have been approved by the FIOCRUZ Animal Ethics Committee (n.49/2013), Brazil. Mice were maintained in 12-h night–day cycle at controlled temperature of 24 °C and food ad libitum.

2.2. Recombinant protein expression and purification

Wb14 protein sequence was obtained in Broad Institute database. After this, back translate was done and optimization of gene sequence was ready using LETO 1.0. Therefore, synthetic Wb14 gene was cloned in pRSETA vector and then transformed into *E. coli* strain BL21. The recombinant bacteria were cultured in LB medium containing 100ug/ml ampicillin and induced with 1mM IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranoside) at 25°C and 150rpm in an incubator shaker. Cells were collected after 4h of induction and lysed by sonication four times at 750W and 30s (Ultra Cell, Sonics) in an appropriate buffer. Thereafter, they were centrifuged at 10.000rpm at 4°C for 15 min and the supernatant was affinity purified by IMAC using Ni-NTA agarose (Macherey-Nagel,

Germany). The rWb14 was stored at -80°C freezer and analyzed by 12.5% SDS-PAGE. The purified protein was used to ELISA and mice immunizations, as described below.

2.3. Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against Wb14 for ELISA assay

Monoclonal antibodies (mAbs)

8 weeks female mice BALB/C were immunized with the purified protein for establishment of hybridomas by intraperitoneal (i.p.) injections. Spleen was removed out from the mice and splenocytes were prepared as single cell suspension and fused with the myeloma cell line SP2/0-Ag14 in a ratio of 10:1 using PEG Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA). Cells were re-suspended in RPMI Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and HAT (1×10^{-2} M hypoxanthine, 4×10^{-5} Maminopterin, 1.6×10^{-3} Mthymidine). Several hybridomas were established and antibody secreting clones were identified by indirect ELISA for specific binding to rWb14. The positive clones for the antibody against rwb14 were expanded and subcloned to monoclonality by limited dilution method. High affinity antibodies were selected through ELISAs wherein hybridoma culture supernatants were reacted with rWb14. The isotype of the mAbs was determined using mouse monoclonal antibody isotyping reagents (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA).

Polyclonal antibodies

Laboratory-bred rabbits were immunized with purified rWb14 with 25ug in complete Freund's adjuvant by subcutaneous injection. It was followed by three booster doses of similar concentration in incomplete Freund's adjuvant 15, 30 and 45 days after the first one. Blood were collected 7days after the final immunization dose, maintained at 4 ° C for 16 h and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. The obtained serum was aliquoted, stored at -80°C and tested for immunoreactivity against rWb14 by indirect ELISA.

2.4. ELISA

Indirect – Antibody recognize

An indirect ELISA was developed to evaluate the monoclonal and polyclonal antibodies immunoreactivity against rWb14. Conditions were optimized for rWb14 coating concentration, antibody dilution, temperature, timing of the incubation periods and secondary antibody conjugate. All washing steps were performed with PBS 0.05% Tween20 (PBS/T), 5 times each. Briefly, a microtitre plate half area (96 wells, Corning 3690, Costar®, USA) was coated with 50µl of 20µg/ml recombinant antigen in 0.1M Carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 4°C, followed by washed. After blocking with PBS 4% BSA and washing step, 100µl antibody sample/well was incubated at 37°C for 1h, washed then followed by 1h incubation with 100µl Anti-

Mouse IgG-Peroxidase or Anti-Rabbit IgG–Peroxidase (Sigma) (1:15.000 in PBS 0,5% BSA). Following a final wash, the color development was accomplished using BD OptEIATM TMB substrate (BD Biosciences, USA) for 15min at room temperature and reaction was stopped with 50ul/well of 1N H₂SO₄. The plates were read at 450nm using a microplate spectrophotometer (Benchmark Plus, BIORAD, USA). Results were expressed as optical density (OD) value.

Sandwich ELISA for rWb14

Microtitre plates were coated with monoclonal antibodies (1:2) 1H10, 3C8 or 6D2 or polyclonal (1:25.000) diluted in 0.1M Carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 4°C, followed by blocking with PBS 4%BSA. Coated wells were incubated with rWb14 antigen by varying concentration (1000ng to 15ng per well) for 1h, followed by incubation for 1h at 37°C with detection antibodies, 1H10, 3C8, 6D2 or polyclonal. Six combinations were done, three of them polyclonal as capture (with 1H10, 3C8 and 6D2 as detection) and three using each monoclonal as capture with polyclonal as detection. After washes with PBS containing 0.05 % tween, the plate was incubated for 1h with 100µl Anti-Mouse IgG-Peroxidase or Anti-Rabbit IgG–Peroxidase (Sigma) (1:15.000 in PBS 0,5%BSA). Following a final wash, the color development was accomplished using BD OptEIATM TMB substrate (BD Biosciences, USA) for 15min at room temperature and reaction was stopped with 50ul/well of 1N H₂SO₄. The plates were read at 450nm using a microplate spectrophotometer (Benchmark Plus, BIORAD, USA). Results were expressed as optical density (OD) value.

2.6. Statistical analysis

All graphics analyses were done using GraphPad prism software version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For calculation antibodies affinity to rWb14, Optical density (OD) was used.

3. Results

3.1 Antigens

The recombinant filarial Wb14 antigen was cloned in pRSERT-A vector, expressed in *E. coli* BL21 and purified by immobilized metal affinity chromatography. The 17 kDa purified rWb14 protein was confirmed by SDS-PAGE. In addition to Wb14 it was used the recombinant WbT protein, an artificial truncated form of Wb14, which demonstrated promising results in an antibody capture assay. WbT was cloned, expressed and purified as Wb14, exhibiting 15.2 KDa (PASTOR et al., 2018).

3.2 Selection and characterization of monoclonal e polyclonal antibodies

Mice were immunized with the purified protein for hybridoma development. Several hybridomas were established and antibody-secreting clones were first identified by ELISA for specific binding to rWb14, expanded and subsequently subcloned to monoclonality. At the end, three clones stable and that presented the highest OD values in the indirect ELISA for rWb14 were select, mAbs 1H10, 3C8 e 6D2.

The dilution curves of the three MABs, 1H10, 3C8 and 6D2, are shown in fig. 1. It is observed that mAb 1H10 shows the highest titers among the three analyzed. Clone 3C8 has levels close to the positive control (fusion supernatant), whereas 6D2 has the lowest antigen recognition titers. The results were similar for both tested antigens, Wb14 and WbT, but the titers were higher to rWb14.

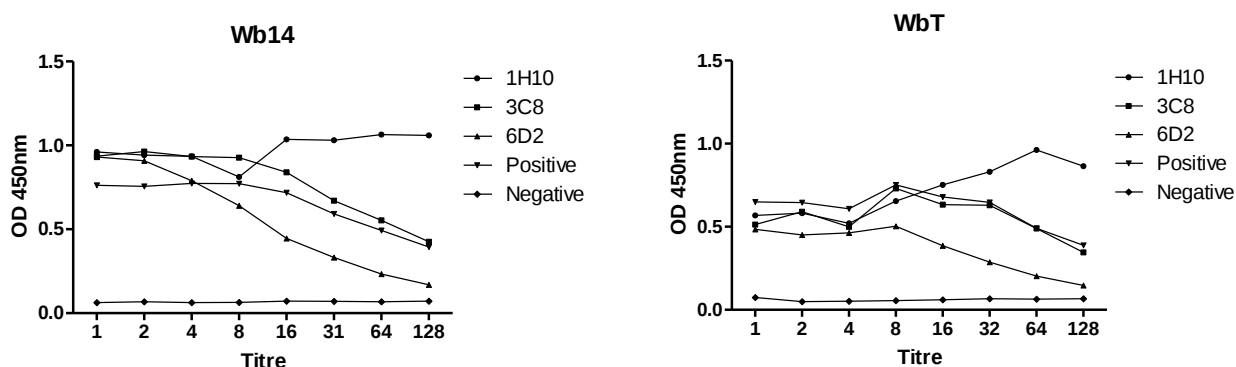


Figure 1. Dilution curves of monoclonal antibodies against rWb14 and WbT. Antigens (1µg/well) were was coated (ELISA) and incubated with the hybridoma culture supernatants 1H10, 3C8 and 6D2 (serially double diluted). Negative control is supernatant from a fusion of a non-immunized animal.

The sensitivity of MABs to rWb14 and rWbT proteins was determined by the antigen dilution curve ELISA (fig. 2). The results showed that mAb 1H10 had a higher affinity to rWb14 and rWbT when compared to the other clones, but the values were similar between the three ones. The lowest concentration of the antigen that could be detected with confidence was 2 ng for MABs 1H10 e 3C8 and 8ng for 6D2 to rWb14 and 34ng for 1H10, 3C8 and 6D2 to rWbT. Wb14 was better recognized than WbT, as well as dilution curves of monoclonal antibodies. Based on the affinity and reactivity with the circulating mf antigens, the three clones were considered for further expansion and capture assay development, and all of them were identified to be of IgG1 subclass.

A dilution curve of the polyclonal antibodies was performed in order to verify the titre to be used in the sandwich ELISA. As can be seen in figure 3, polyclonal antibodies were able to recognize both Wb14 and WbT antigens up to the last dilution performed, 1: 100.000. In view of the results, we chose to use the 25.600 titer in the sandwich ELISA, because at this point the OD

remains at about 1.0 for positive serum, whereas the pre-immune serum has a sharp drop (OD 0.1455), near to the blank of the experiment (OD 0.067).

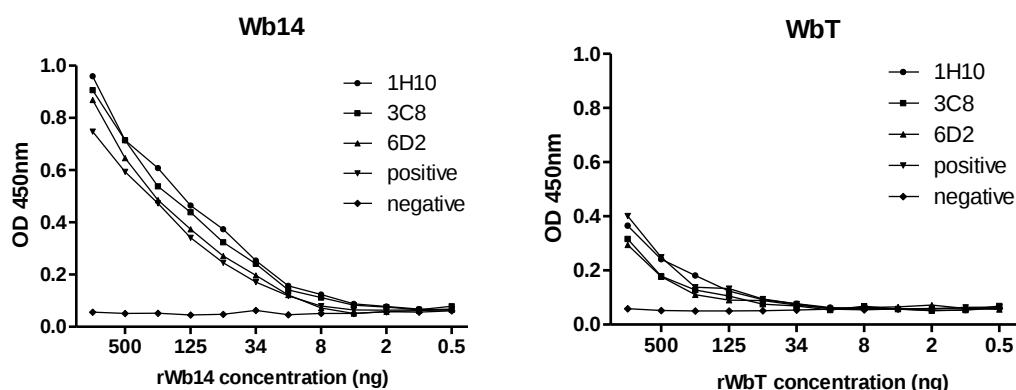


Figure 2. rWb14 and rWbT antigens dilution curve ELISA to monoclonal antibodies. Wells were coated with varying concentrations (1000 to 1 ng) of rWb14 and rWbT protein and incubated with undiluted hybridoma culture supernatants.

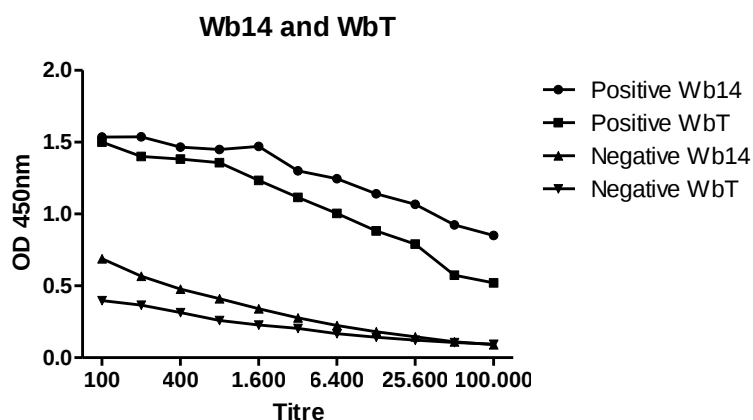


Figure 3. Dilution curves of polyclonal antibodies against rWb14 and rWbT. Antigens (1 μ g/well) were coated (ELISA) and incubated with the rabbit serum of an immunized animal (serially diluted). Negative control is the serum collected before the immunization.

3.3 Sandwich ELISA for the measurement of recombinant antigen concentration

Sandwich ELISA was standardized with various combinations of polyclonal and monoclonal antibodies as capture and detection antibodies, and varying concentrations of the recombinant antigen Wb14. The results (fig 4) showed that polyclonal was the best as capture, because OD varying between 1.1 and 0.38 while when monoclonal was used as capture OD values were since 0.55 to 0.15. Using the combination of polyclonal as capture and detection with monoclonal antibodies (1H10, 3C8 and 6D2) showed similar OD values in all rWb14 concentrations. But the best combination was polyclonal as capture and 1H10 as detection, because it exhibited higher OD in all rWb14 concentrations with a sensitivity of 15 ng (Fig. 4). Therefore, this combination will be used for analyzing clinical serum samples to detect circulating filarial antigens (CFA).

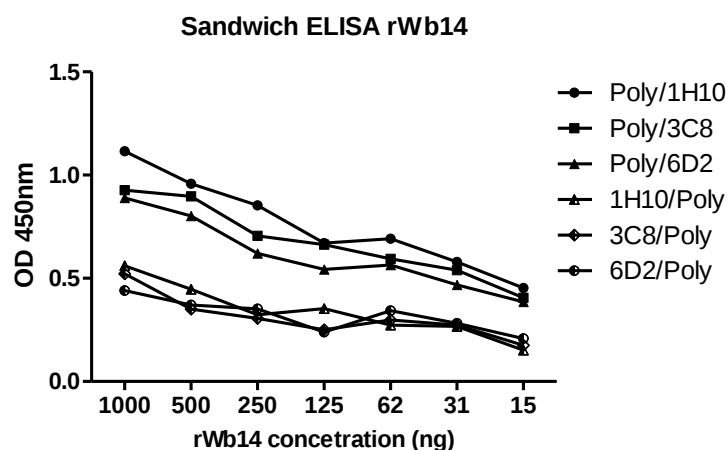


Figure 4. Sandwich ELISA for rWb14. The wells of ELISA plate were coated with monoclonal 1H10, 3C8 or 6D2 (1:2) or polyclonal antibodies (1:25.000) diluted in 0.1M Carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 followed by incubation with rWb14 protein at varying concentration (1000ng to 15ng). Binding of the antigens was detected by mouse or rabbit secondary antibody-HRP. The assay was developed using the substrate – TMB.

4. Discussion

The results of the present work showed that the monoclonal and polyclonal antibodies produced against the recombinant antigen rWb14 recognize this protein, and rWbT, an artificially truncated form produced from the removal of the nucleotide sequence from the 17 amino acids after the first methionine N'- Terminal of Wb14 (PASTOR et al., 2018). An antigen capture assay ELISA was developed, which was able to recognize up to 15ng of rWb14 and rWbT, with the best option to use the polyclonal antibody as capture and the monoclonals 1H10, as detection. After the results obtained, the study aim is now to purify such antibodies for use in a test for the capture of circulating filarial antigens in serum samples from individuals with Lymphatic Filariasis.

The target antigen of this work was Wb14, which is a protein derived from *W. bancrofti*, a natural truncated form of WbSXP-1 with a stop codon at the 460 nucleotide position of the gene (PANDIARAJA et al., 2010). Both Wb14 and WbSXP-1 are part of a nematode proteins family identified as potent immunogens in many parasite infections (RAO et al., 2000). As additional information on the importance of Wb14 for LF in a comparison made between WbSXP-1 and Wb14, it was found that Wb14 constitutes 100% and 70% of the total obtained from these two proteins from worms of the South and North regions of India, respectively (PANDIARAJA et al., 2010). Despite this, many studies have already developed antigen capture tests from antibodies produced against WbSXP-1 (LALITHA et al., 2002; JANARDHAN et al., 2011; RAVISHANKARAN et al., 2014; 2016), but to date no works had been done for Wb14. These data reinforce the need for the development of antibodies against Wb14 to produce a diagnosis based on the capture of this antigen.

The two commercially available antigen capture kits indicated by the WHO for the diagnosis of FL are the immunochromatographic-AD12 card test (POC-ICT), the gold standard (BinaxNOW, Binax, Inc., Maine, USA) (WEIL et al., 1997) and ELISA Og4C3, as an auxiliary tool (MORE; COPEMAN, 1990). Interestingly, both were developed from protein extracts of different worms from those that cause FL, *W. bancrofti*, *B. malayi* and *B. timori* (BURKOT et al., 2006).

The first to be developed was Og4C3-ELISA, which uses an IgM class monoclonal antibody produced in response to *Onchocerca gibsoni*, that reacts with the *W. bancrofti* filarial antigens in serum or plasma samples (MORE; COPEMAN, 1990). POC-ICT uses a IgG class monoclonal antibody produced from *Dirofilaria immitis*, that captures filarial antigens up to 200KDa in size, mainly from adult worms (WEIL et al., 1997). In the present work, the monoclonal antibodies produced against Wb14 were all of the IgG1 class, different from Og4C3 ELISA and similar to POC-ICT.

Regarding the sensitivity and specificity of the Og4C3-ELISA and POC-ICT tests, they are extremely high, around 100% for both evaluation parameters, however, they are weak when microfilaremia is small or absent (LAMMIE , et al., 1994; ROCHA et al., 2009). A study carried out in schools in Pernambuco, Brazil with children aged 4 to 15 years, demonstrated the efficiency of the ICT in comparison with the parasitological and Og4C3-ELISA. Therefore, it has been reported as a diagnosis of choice for the identification of filaremic individuals who have not yet started mass treatment (MDA) due to their high sensitivity and ease of execution (OLIVEIRA et al., 2014).

One of the problems found in the antigen capture assays is the presence of a prolonged positive antigen, being evidenced even after expressive anti-filarial treatments. The positive persistence leads to difficulties in the identification of patients with active infection of those with past one and of individuals not infected but exposed to infective larvae, even if sporadic or continuous. Therefore, the application of these techniques in the services of monitoring and control of LF becomes limited, and is not useful to evaluate the cure criteria of filaremic patients (SCHUETZ et al., 2000; FREEDMAN et al., 2001; WEIL & RAMZY, 2007).

Although the Og4C3 and ICT tests are already established in the LF diagnostic, the fact that there are still no 100% effective motivates several studies in the area in search of a better antigen capture test. A pioneer work has developed polyclonal antibodies against BmSXP-1 and WbSXP-1 proteins, showing to be competent in recognizing the antigens in the sera of patients infected with *B. malayi* and *W. bancrofti* (LALITHA et al., 2002). The intention was to develop a specific test for *B. malayi* infection and another for *W. bancrofti*. For this, a sandwich ELISA was used using the polyclonal antibody produced in mouse as capture and that produced in rabbit as detection. With

this, positivity was obtained in about 85% of the filaremic patients, with no significant difference between the tests (LALITHA et al., 2002). Here in the present study, a sandwich ELISA was used using polyclonal antibody produced in rabbit as capture and monoclonal produced in mice as detection, and the patient's serum samples will be tested after antibody purification.

In later works, WbSXP-1 was used as a target for the production and evaluation of monoclonal antibodies, mAb (JANARDHAN et al., 2011; PANDEY et al., 2011; VISHAL et al., 2014). The first report of mAb produced against WbSXP-1, developed a sandwich ELISA with rabbit polyclonal antibodies as capture and a mouse-produced monoclonal as detection (JANARDHAN et al., 2011), as well as in the present study. This work was successful in identifying patients with *B. malayi* or *W. bancrofti* infection, but cross-reaction to other helminths was not tested (JANARDHAN et al., 2011). In a subsequent study, there was also production of mAb from WbSXP-1 that efficiently detected the native microfilariae protein, the recombinant form as well as the serum of FL patients (PANDEY et al., 2011). In this work, the ELISA sandwich used two monoclonal antibodies (IgG2a and IgM) as capture antibodies and polyclonal as detection. All MF were positive, no CP and NE samples were detected, but 16% of EN were detected in the test (PANDEY et al., 2011).

Thereafter, the antibodies produced by PANDEY et al., 2011 were tested in two works (VISHAL et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2014). In the first, the slide method was described, which relies on the resuspension of blood contained in a thick drop slide for antigen capture analysis by ELISA (VISHAL et al., 2014). In this work, of the 1106 samples tested, there was an increase of positivity of 7.32% when compared to the thick microscopic smear, revealing the existence of false negatives. This methodology is easy, cheaper and less invasive than venous blood collection. Such characteristics are ideal for epidemiological surveys in order to assess populations undergoing mass treatment, assisting the GPEFL (VISHAL et al., 2014).

The second work used the monoclonal antibodies against WbSXP-1 (PANDEY et al., 2011) together with another produced against a *B. malayi* protein, BmVAH (vespid allergen homologue) (RAVISHANKARAN et al., 2014). This combination, called VS, showed better recognition of patients infected with both parasites (*B. malayi* and *W. bancrofti*) than when antibodies were used isolated (RAVISHANKARAN et al., 2014). As in the present work, the sandwich ELISA was able to detect up to 15ng of the recombinant proteins, and in addition 100% of those infected with *B. malayi* and *W. bancrofti* were positive and no serum from the CP, EN and NE groups were identified (RAVISHANKARAN et al., 2014).

Two studies produced monoclonal antibodies against *Brugia malayi* proteins (JAWAHARLAL et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016). The first one was able to identify

patients infected by *B. malayi* and *W. bancrofti* with an mAb produced against the microfilarial sheath protein of *B. malayi*, called Shp-1 (JAWAHARLAL et al., 2014). When compared to the WbSXP-1 and Og4C3 antigen capture tests, all detected MF of *W. bancrofti*, Shp-1 and WbSXP-1 to *B. malayi* MF and only Shp-1 detected EN (12%) and CP (29%). These results showed that this last test is important for the monitoring of mass treatment, since it is able to identify patients who came in contact with the parasites (JAWAHARLAL et al., 2014). Similarly, antibodies produced against *B. malayi* Abundant Larval Transcript-2 (ALT-2) were able to recognize 57% of the EN individuals of an area of high filarial infection, whereas VAH (RAVISHANKARAN et al., 2014) recognized 52% and WbSXP-1 (PANDEY et al., 2011) 0 % of these. The test described may be useful for the detection of newly installed filarial infections in endemic regions of LF-affected countries (RAVISHANKARAN et al., 2016).

In summary, the Wb14 antigen capture sandwich ELISA developed in this work proved to be a viable option for LF diagnosis, since it detected a similar amount of recombinant protein in a study that developed a test capable of recognizing 100% MF individuals (RAVISHANKARAN et al., 2014). The perspective is that the ELISA can differentiate samples of MF individuals from the CP, EN and NE groups. The next steps are to purify the antibodies and associate them with biotin to standardize a test that does not contain interferers present in the hybridoma culture medium as well as in the serum of the immunized rabbits. Therefore, if the test is capable of identifying individuals with active LF infection, it should also be analyzed with samples from other filarial and nearby worms, such as *O. volvulus*, *Loa loa*, *B. malayi* and *B. timori*, in order to be used in other endemic countries, assisting GPEFL.

5. References

- ABDUL RAHMAN, R.; HWEN-YEE, C.; NOORDIN, R. Pan LF-ELISA using BmR1 and BmSXP recombinant antigens for detection of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**, Londres, v. 6, n.1, p.10, Out. 2007.
- AGUIAR-SANTOS, A. M.; MEDEIROS, Z.; BONFIM, C. et al. Epidemiological assessment of neglected diseases in children: Lymphatic filariasis and soil-transmitted helminthiasis. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 250–255, Abr. 2013.
- ALCÂNTARA DE SOUZA, P. F.; BRANDÃO FERREIRA DA SILVA, E. C.; AGUIAR SANTOS, A. M. et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Atendidos No Ambulatório Do Serviço De Referência Nacional Em Filarioses Do Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-Pe. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania v. 43, n. 4, p. 427–435, jan. 2015.
- ALHASSAN, A.; LI, Z.; POOLE, C. B.; CARLOW, C. K. S. Expanding the MDx toolbox for

filarial diagnosis and surveillance. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 391–400, Maio 2015.

ALMOND, N. M.; PARKHOUSE, R. M. The Ig distribution of anti-phosphorycholine responses in mice infected with parasitic nematodes. **Immunology**, Oxford, v. 59, p. 633–635, Dez. 1986.

AMARAL, F. et al. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 753–757, Jun. 1994.

BABU, S.; NUTMAN, T. B. Immunopathogenesis of lymphatic filarial disease. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 34, n. 6, p. 847–861, Out. 2012.

BASKAR, L. K. V.; SRIKANTH, T. R.; SUBA, S.; MODY, H. C.; DESAI, P. K.; KALIRAJ, P. Development and evaluation of a rapid flow-through immuno filtration test using recombinant filarial antigen for diagnosis of brugian and bancroftian filariasis. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 48, n. 7, p. 519–25, Jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BURKOT, T. R.; DURRHEIM, D. N.; MELROSE, W. D.; SPEARE, R.; ICHIMORI, K. The argument for integrating vector control with multiple drug administration campaigns to ensure elimination of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**, Londres, v. 5, n. 10, p. 1-7, Ago. 2006.

CANO, J. et al. The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, n. 1, p. 1-19, Out. 2014.

CHANDRASHEKAR, R.; CURTIS, K. C.; RAMZY, R. M.; LIFTIS, F.; LI, B. W.; WEIL, G. J. Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 261–271, Abr. 1994.

CHANTEAU, S.; GLAZIOU P.; MOULIA-PELAT, J. P.; PLICHART C.; LUQUIAUD P. C. J. Low positive predictive value of anti-*Brugia malayi* IgG and IgG4 serology for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 88, n. 6, p. 661–2, Nov. 1994.

CHRISTIANA, O.; OLAJUMOKE, M; OYETUNDE, S. Lymphatic filariasis and associated morbidities in rural communities of Ogun State, Southwestern Nigeria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Philadelphia, v. 12, p. 95–101, Jan. 2014.

DAMGAARD, J. et al. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. **Acta Tropica**, Basel, v. 161, p. 26–32, Set. 2016.

DISSANAYAKE, S.; XU, M.; NKENFOU, C.; PIESSENS, W. F. Molecular cloning and serological characterization of a *Brugia malayi* pepsin inhibitor homolog. **Molecular and**

Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 143–146, Nov. 1993.

DONADEU, M.; LIGHTOWLERS, M. W.; FAHRION, A. S.; KESSELS, J.; ABELA-RIDDER, B. Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire. **The Weekly Epidemiological Record**, Genebra v. 3, n. 47, p. 445–452, Set. 2009.

DREYER, G.; MATTOS, D.; NORÕES, J. Quilúria. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 460–4, Set. 2007.

DREYER, G.; DREYER, P.; NORÕES, J. Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 43–50, Jan. 2002.

DREYER, G.; NORÕES, J.; FIGUEREDO-SILVA, J.; PIESENS, W. F. Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: A Clinical Perspective. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 12, 544–548, Dez. 2000.

FICORUZ. **HISTÓRIA DA FILARIOSE**. Dicionário Histórico-Biográfico das Ciências da Saúde no Brasil (1832-1930). Disponível em <<http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br/iah/pt/index.php>>. Acesso: 05 Ago. 2017.

FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 38, p. 131–6, Mar. 2005.

FOX, L. M. et al. Ultrasonographic examination of Haitian children with lymphatic filariasis: A longitudinal assessment in the context of antifilarial drug treatment. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 72, n. 5, p. 642–648, Maio 2005.

FREEDMAN, D. O. et al. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. **Trop Med and Int Health**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 37–41, Jan. 2001.

GERUSA, D.; DENISE, M.; JOSÉ, F. S.; JOAQUIM, N. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 355–362, Jan. 2009.

GURGEL, M. F. B. C.; CARNEIRO, F.; COUTINHO, E. Ciência no século XIX: A contribuição brasileira para a descoberta do agente etiológico da filariose linfática. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 39, n. 4, p. 251–259, Out. 2010.

HARNETT, W.; BRADLEY, J. E.; GARATE, T. Molecular and immunodiagnosis of human filarial nematode infections. **Parasitology**, London, v. 117, p. S59-71, Jul. 1998.

ICHIMORI, K. MDA—Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and Health**, Oxford, v. 42, p. S21–S24, Jun. 2014.

JANARDHAN, S.; PANDIARAJA, P.; PANDEY, V.; KARANDE, A.; KALIRAJ, P. Development

and characterization of monoclonal antibodies against WbSXP-1 for the detection of circulating filarial antigens. **Journal of Helminthology**, Londres, v. 85, n. 1, p. 1–6, Mar. 2011.

JANARDHAN, S. ET AL. Production, purification and diagnostic application of filarial recombinant protein WbSXP-1 expressed in salt inducible *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 34, n. 10, p. 675–683, Out. 2007.

JAWAHARLAL, J.; MADHUMATHI, J.; PRINCE, R.; KALIRAJ, P. Repeat region of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) carries Dominant B epitopes recognized in filarial endemic population. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 3, p. 454–458, Set. 2014.

JAWAHARLAL, J. P. et al. Evaluation of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) as a diagnostic antigen for human lymphatic filariasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 78, n. 3, p. 249–254, Mar. 2014.

JOSEPH, H. M.; MELROSE, W. Applicability of the filter paper technique for detection of antifilarial IgG4 antibodies using the Bm14 filariasis CELISA. **Journal of Parasitology Research**, Londres, Fev. 2010.

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**, São Francisco, v. 6, n. 12, Dez. 2012.

LALITHA, P. 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.**, Tokyo, v. 46, n. 5, p. 327–332, Nov. 2002.

LAMMIE, P. J.; HIGHTOWER, A.W.; EBERHARD, M. L. The age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 51, p. 348–355, Set. 1994.

LAMMIE, P. J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. **Filaria Journal**, Londres, v. 3, n. 1, p. 1-5, Set. 2004.

MAIZELS, R.M.; BURKE, J.; DENHAM, D. A. Phosphorylcholine bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis in somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. **Parasite Immunol.**, Oxford, 9, 49–66, Jan. 1987.

MARY, K.; HOTI, S. L.; KRISHNAMOORTHY, K.; DAS, P. K.; RAHMAH, N. Detection of filarial specific IgG4 antibodies in individuals residing in endemic areas using panLFRAPID test card. **Journal of Parasitic Diseases**, Nova Deli, v. 35, n. 1, p. 77–79, Jun. 2011.

MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; MARTINS, M. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 4, p. 779–780, Jun. 2010.

- 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, Dez. 1990.
- MWAKITALU, M. E.; MALECELA, M. N.; PEDERSEN, E. M.; MOSHA, F. W.; SIMONSEN, P. E. Urban lymphatic filariasis in the metropolis of Dar es Salaam, Tanzania. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 6, n. 1, p. 1–13, Set. 2013.
- NOORDIN, R. et al. Multicentre evaluations of two new rapid IgG4 tests (WB rapid and panLF rapid) for detection of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**, Londres, v. 6, n. 9, p. 1-4, Out. 2007.
- NORÕES, J. et al. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, Londres, v. 90, p. 55–56, Jan. 1996.
- NUNES, L. V. et al. Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 6, n. 7, p. 521–526, Jul. 2016.
- NUTMAN, T. B. Insights into the pathogenesis of disease in human lymphatic filariasis. **Lymphatic Research and Biology**, Larchmont, v. 11, n. 3, p. 144–8, Set. 2013.
- OLIVEIRA, P. et al. Evaluation of diagnostic tests for *Wuchereria bancrofti* infection in Brazilian schoolchildren. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 3, p. 359–366, Maio 2014.
- OTTESEN, E. A. Editorial: The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 591–594, Set. 2000.
- PANDEY, V.; MADHUMATHI, J.; KARANDE, A. A.; KALIRAJ, P. 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, Set. 2011.
- PANDIARAJA, P.; ARUNKUMAR, C.; HOTI, S. L.; RAO, D. N.; KALIRAJ, P. Evaluation of synthetic peptides of WbSXP-1 for the diagnosis of human lymphatic filariasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 68, n. 4, p. 410–415, Dez. 2010.
- PANDIARAJA, P.; MURUGAN, V.; HOTI, S. L.; KALIRAJ, P. Molecular characterization of a truncated antigen (Wb14) of SXP-1 of *Wuchereria bancrofti* from four endemic regions in India. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 125, n. 3, p. 236–243, Jul. 2010.
- PASTOR, A. et al. Evaluation of the recombinant antigens Wb14 and WbT for the capture antibody diagnosis of lymphatic filariasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, p. e170435, Mar. 2018.
- RACHOU, R. G. Transmissores da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 267–8, Set. 1956.

- RACHOU, R. G. Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 79–100, Dez. 1957.
- RAHMAH, N. et al. A recombinant antigen-based IgG4 ELISA for the specific and sensitive detection of *Brugia malayi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 95, n. 3, p. 280–284, Maio 2001.
- RAMZY, R. et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. **Lancet**, Londres, v. 367, n. 9515, p. 992–999, Jun. 2006.
- 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, Mar. 2000.
- RAVISHANKARAN, R. et al. An evaluation of antigen capture assays for detecting active filarial antigens. **J Helminthol**, Londres, v. 89, n. 3, p. 352–358, Maio 2014.
- RAVISHANKARAN, R. et al. Evaluation of immuno diagnostic assay for the exposure of stage specific filarial infection. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 61, n. 2, p. 232–240, Mar. 2016.
- 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**, São Francisco, v. 8, n. 5, p. 3–6, Maio 2014.
- ROCHA, A. Available laboratory diagnostic methods of lymphatic filariasis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 265–270, Ago. 2000.
- ROCHA, A. et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 621–625, Jul. 2009.
- 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Recife, v. 99, n. 1, p. 101–105, Fev. 2004.
- 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**, Goiania, v. 39, n. 3, p. 233–249, Jul. 2010.
- 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, Abr. 2000.
- SILVA, B. C. E.; SILVA, L. A. M.; OLIVEIRA, S. A. P. Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial – Revisão. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 177–181,

Ago. 2008.

SIMONSEN, P. E. et al. Lymphatic filariasis control in Tanzania: Effect of repeated mass drug administration with ivermectin and albendazole on infection and transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 4, n. 6., p. e696, Jun. 2010.

STEEL, C. et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 8, p. 1155–1161, Ago. 2013.

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**, Basel, v. 90, n. 3, p. 255–261, Maio 2004.

TERHELL, A. J. Long-term follow-up of treatment with diethylcarbamazine on anti-filarial IgG4: Dosage, compliance, and differential patterns in adults and children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 33–39, Jan. 2003.

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**, São Francisco, v. 9, n. 7, Jul. 2014.

WEIL, G. J. et al. Laboratory and Field Evaluation of a New Rapid Test for Detecting *Wuchereria bancrofti* Antigen in Human Blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 1, p. 11–15, Jul. 2013.

WEIL, G. J. et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Tropica**, Baltimore, v. 120, n. 1, p. S19–S22, Set. 2011.

WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. R. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 78–82, Fev. 2007.

WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitol Today**, Cambridge, v. 13, n. 10, p. 401–4, Out. 1997.

WEILL, G. J. et al. The impact of repeated rounds of mass drug-administration with diethylcarbamazine plus albendazole on bancroftian filariasis in Papua New Guinea. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 2, n. 12, Dez. 2008.

WHO. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. **Weekly Epidemiological Record Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, Genebra, v. 39, n. 91, p. 441–460, Set. 2016.

WONGKAMCHAI, S.; SATIMAI, W.; LOYMEK, S.; NOCHOT, H.; BOITANO, J. J. An ELISA kit with two detection modes for the diagnosis of lymphatic filariasis. **Journal of Helminthology**,

Londres, v. 89, n. 5, p. 552-8, Set. 2014.

WUCHERER, O. Notícia preliminar sobre vermes de uma espécie ainda não descripta encontrados na urina de doentes de hematúria intertropical no Brasil. **Gazeta Médica Da Bahia**, Salvador v. 3, p. 97–99, Jul. 1868.

6 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados do presente trabalho mostraram que os ELISAs de captura de anticorpos anti-Wb14 e anti-WbT apresentaram similar sensibilidade e maior especificidade para *W. bancrofti* do que o BM14 CELISA, que é um teste bem consolidado na área (JOSEPH; MELROSE, 2010; NUNES et al., 2016; SIMONSEN et al., 2010; WEIL et al., 2011; WEIL et al., 2008). Além disso, a partir dos anticorpos monoclonais e policlonais produzidos contra a proteína recombinante rWb14 foi desenvolvido um ELISA sanduiche de captura de antígenos capaz de reconhecer até 15ng da rWb14 e da rWbT, tendo como melhor opção utilizar o anticorpo policlonal como captura e o monoclonal 1H10 como detecção.

Antes do advento da Tecnologia do DNA recombinante, os testes de captura de anticorpos eram baseados no extrato protéico bruto dos vermes que causavam as doenças (ALMOND; PARKHOUSE, 1986; MAIZELS et al., 1987). Esses testes possuíam dificuldades de execução devido ao laborioso procedimento de produção do extrato bem como pela reação cruzada devido à presença de muitas proteínas e outros componentes na mistura. Diante desse cenário, os antígenos recombinantes apareceram como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de um diagnóstico de captura de anticorpos para a FL. Dentre os que já foram utilizados, destacam-se o Bm33 (DISSANAYAKE et al., 1993), Bm14 (CHANDRASHEKAR et al., 1994), WbSXP-1 (RAO et al., 2000), BmRI (SUPALI et al., 2004) e Wb123 (KUBOFCIK et al., 2012). O mesmo é válido para os testes de captura de antígenos, pois os primeiros desenvolvidos utilizaram extratos protéicos de vermes, como o Og4C3 (MORE; COPEMAN, 1990) e o ICT (WEIL et al., 1997), oriundos dos parasitas *Onchocerca gibsoni* e *Dirofilaria immitis*, respectivamente. No entanto, apesar do desenvolvimento de anticorpos contra antígenos recombinantes (JANARDHAN et al., 2011; PANDEY et al., 2011; JAWAHARLAL et al., 2014; VISHAL et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016), no caso do teste de captura de antígenos, o kit POC-ICT ainda é considerado o padrão ouro e o ELISA Og4C3 é o método auxiliar indicados pela OMS para o diagnóstico da FL (WHO, 2016).

A proteína alvo deste trabalho foi a Wb14, que é oriunda de *W. bancrofti*, uma forma truncada natural da WbSXP-1 com um stop codon na posição do nucleotídeo 460 do gene (PANDIARAJA et al., 2010). Além disso, foi utilizada também a WbT, uma forma truncada artificialmente produzida a partir da retirada da sequência de nucleotídeos referente aos 17 aminoácidos após a primeira metionina N'-terminal da Wb14 (PASTOR et al., 2018). Ambas Wb14 e WbSXP-1 pertencem a uma família de proteínas de nematóides identificada como potentes imunógenos em muitas infecções por parasitas (RAO et al., 2000).

Baseado no que existe na literatura atual, três razões podem ser citadas para justificar a utilização da Wb14 para o desenvolvimento de testes de captura de antígenos e de anticorpos para o diagnóstico da FL. Primeiro, em uma comparação feita entre a WbSXP-1 e Wb14, percebeu-se que a Wb14 constitui 100% e 70% do total obtido dessas duas proteínas a partir de vermes da região Sul e Norte da Índia, respectivamente (PANDIARAJA et al., 2010a). Segundo, a região que difere a WbSXP-1 da Wb14 de 29 aminoácidos C' terminal tem homologia com muitos patógenos, incluindo algumas espécies de *Plasmodium* e *Leishmania infantum* (PANDIARAJA et al., 2010), o que poderia aumentar a reatividade cruzada. Por fim, até o momento não existe nenhum trabalho avaliando a Wb14 como alvo para teste de captura de antígenos bem como de anticorpos, além do estudo que analisou a resposta de anticorpos IgG humanos contra cinco amostras de indivíduos microfilarêmicos (PANDIARAJA et al., 2010a). No presente estudo, além de ser avaliada a resposta do isotipo IgG4 específica para FL, o número de amostras foi bem mais significativo, 30 indivíduos microfilarêmicos. Apesar da importância da Wb14, muitos estudos já desenvolveram testes de captura de antígenos a partir de anticorpos produzidos contra a WbSXP-1 (LALITHA et al., 2002; JARNADHAN et al., 2010; RAVISHANKARAN et al., 2015; RAVISHANKARAN et al., 2016), além daqueles que utilizaram esta proteína para produzir testes de captura de anticorpos (RAO, 2000; BASKAR et al., 2004; LAMMIE, 2004; JANARDHAN et al., 2007; PANDIARAJA et al., 2010b). Mas até o momento, o mesmo não foi feito para a Wb14.

Complementando o que já existe, a WbT apresenta-se como uma nova alternativa para o diagnóstico da FL, uma vez que os três peptídeos que mostraram os melhores resultados no reconhecimento prévio de indivíduos filarêmicos pela Wb14 estão presentes na região comum a WbT (PANDIARAJA et al., 2010b) e a remoção dos primeiros 17 aminoácidos hidrofóbicos da Wb14 pode facilitar sua expressão bem como seu reconhecimento pelos anticorpos. Quanto a afinidade pela ligação aos anticorpos, o ELISA anti-WbT apresentou acurácia de 98,67% contra 98,11% do ELISA anti-Wb14, mostrando que o teste produzido a partir do antígeno WbT tem uma maior probabilidade em reconhecer uma amostra positiva para filariose linfática, apesar da diferença discreta.

Com relação aos testes de captura de anticorpos para o diagnóstico da FL, um trabalho que utilizou o antígeno Bm14, mostrou que 90% dos soros de indivíduos com FL de regiões da Índia e Egito eram reativos contra esta proteína e houve reação cruzada apenas com *Onchocerca volvulus* (CHANDRASHEKAR et al., 1994). Resultado semelhante foi obtido por LAMMIE, 2004, quando a sensibilidade do ELISA anti-Bm14 foi de 91% para *W. bancrofti* e 96% para *B. malayi*, com reação cruzada para *O. volvulus* e *Loa loa* (LAMMIE et al., 2004). Por fim, outro trabalho fez uma

avaliação do kit comercial CELISA BM14, no qual detectou-se 91% das amostras de infectados com *Brugia* e 98% daqueles com *W. bancrofti*. Enquanto isso, houve pequena reação cruzada com indivíduos infectados com *Strongyloides* e *Ascaris*, mas o grupo não endêmico não foi reconhecido (WEIL et al., 2011). No presente estudo a sensibilidade do CELISA BM14 foi de 90% corroborando com os trabalhos anteriores, mas a especificidade foi bem menor, pois 30% dos indivíduos não endêmicos foram positivos nas amostras brasileiras. E assim como antes, houve reação cruzada com *Strongyloides*.

O outro kit comercial de disponível no mercado, que será utilizado em breve pelo SRNF, é o Filaria Detect™ IgG4 ELISA. Este baseia-se na captura de anticorpos contra o antígeno Wb123 oriundo da larva L3 de *W. bancrofti*. O estudo inicial com a Wb123 mostrou que este antígeno poderia ser um boa escolha para a análise de pessoas recém infectadas (KUBOFCIK et al., 2012). Logo em seguida, foi desenvolvido um teste rápido de captura de anticorpos anti-Wb123 com a intenção de identificar indivíduos que entraram em contato com a forma L3 da *W. bancrofti*, ou seja, infectados recentemente. Este apresentou reconhecimento de 91,5% dos infectados com *W. Bancrofti*, reação cruzada com *O. volvulus*, mas não com *Loa loa* bem como nenhum indivíduo com *Strongyloides* e não infectado foi positivo no teste (STEEL et al., 2013). No presente estudo, este teste não foi tilizado como parâmetro de comparação, visto que ainda não está estabelecido na rotina do SRNF-FIOCRUZ-PE.

Com relação a WbSXP-1, o ELISA de captura de anticorpos IgG4 anti-WbSXP-1 apresentou 100% de sensibilidade para infectados com *W. bancrofti*, enquanto que o soro dos crônicos, endêmicos normais e não endêmicos não foram reconhecidos. No entanto, houve reação cruzada com *O. volvulus* e *Loa loa* (RAO et al., 2000). No mesmo trabalho citado acima, LAMMIE e colaboradores, 2004, encontrou 91% de sensibilidade para infectados com *W. bancrofti*, 68% para *B. malayi*, e novamente reação para *O. volvulus* e *Loa loa* (LAMMIE et al., 2004). Levando em consideração tal potencial, foi feito um estudo que testou ambas, WbSXP-1 e Wb14, contra apenas cinco amostras de soro humano no ELISA (PANDIARAJA et al., 2010a). As duas proteínas mostraram reatividade similar contra a IgG humana presente no soro, especialmente de microfilarêmicos, elevando a Wb14 a potencial antígeno para o diagnóstico da FL.

Os dois kits comerciais de captura de antígenos indicados pela OMS para o diagnóstico da FL são o the “point of care” imunocromatografico-AD12 card test” (POC-ICT) (BinaxNOW, Binax, Inc., Maine, USA) (WEIL et al., 1997) e o ELISA Og4C3, como uma ferramenta auxiliar (MORE; COPEMAN 1990). O primeiro a ser desenvolvido foi o Og4C3-ELISA, o qual utiliza um anticorpo monoclonal da classe IgM produzido em resposta ao extrato proteico de *Onchocerca*

gibsoni (MORE; COPEMAN, 1990). Já o POC-ICT utiliza um anticorpo monoclonal da classe IgG produzido a partir do extrato do verme *Dirofilaria immitis* (WEIL et al., 1997). No presente trabalho, os anticorpos monoclonais produzidos contra a Wb14 foram todos da classe IgG1, diferente do Og4C3 ELISA e similar ao POC-ICT.

Com relação à sensibilidade e especificidade, os testes Og4C3-ELISA e POC-ICT apresentam números em torno de 100% para ambos os parâmetros de avaliação, entretanto deixam a desejar quando a microfilaremia é ausente ou diminuta (LAMMIE et al., 1994; ROCHA et al., 2009). Um dos problemas encontrado nos testes de captura de antígenos é a presença de uma antigenemia positiva prolongada, sendo evidenciada mesmo após expressivos tratamentos antifilarioses. A persistência da antigenemia leva à dificuldades na identificação de pacientes com infecção ativa daqueles com infecção passada e de indivíduos não infectados porém expostos às larvas infectantes, mesmo que de forma esporádica ou contínua. Diante disto, a aplicação dessas técnicas nos serviços de monitoramento e controle da filariose linfática, se torna limitada, não sendo útil para avaliar o critério de cura de pacientes filarêmicos (FREEDMAN et al., 2001; RAMZY et al., 2006; SCHUETZ et al., 2000).

Apesar dos testes Og4C3 e ICT já estarem estabelecidos no mercado, o fato de ainda não existir um diagnóstico 100% eficaz, motiva várias pesquisas na área em busca de um melhor teste de captura de antígenos. Um trabalho pioneiro desenvolveu anticorpos policlonais contra as proteínas BmSXP-1 e WbSXP-1, mostrando serem competentes em reconhecer os antígenos nos soros de pacientes infectados com *B. malayi* e *W. bancrofti* (LALITHA et al., 2002). A intenção foi desenvolver um teste específico para infecção por *B. malayi* e outro para *W. bancrofti*. Para tal, foi utilizado um ELISA sanduiche usando o anticorpo policlonal produzido em camundongo como captura e o produzido em coelho como detecção. Com isso, foi obtido positividade em cerca de 85% dos pacientes filarêmicos, sem diferença significativa entre os testes (LALITHA et al., 2002). No presente estudo foi utilizado um ELISA sanduiche usando o anticorpo policlonal produzido em coelho como captura e monoclonal produzido em camundongos como detecção, e as amostras de soro dos pacientes serão testadas após a purificação destes anticorpos.

Em trabalhos posteriores, a WbSXP-1 foi utilizada como alvo para a produção e avaliação de anticorpos monoclonais (AcMo) (JANARDHAN et al., 2010; PANDEY et al., 2011; VISHAL et al., 2014). O primeiro relato de AcMo produzido contra WbSXP-1, desenvolveu um ELISA sanduiche com anticorpos policlonais de coelho como captura e um monoclonal produzido em camundongo como detecção (JANARDHAN et al., 2010), assim como no presente estudo. Este trabalho mostrou sucesso na identificação de pacientes com infecção por *B. malayi* ou *W. bancrofti*, mas reação cruzada para outros helmintos não foi testada (JANARDHAN et al., 2010).

Em trabalho subsequente, também houve produção de AcMo que detectou de forma eficiente a proteína nativa de microfilarias, a forma recombinante bem como soro de pacientes com FL (PANDEY et al., 2011). Neste trabalho, o ELISA sanduiche utilizou dois monoclonais (IgG2a e IgM) como anticorpos de captura e o policlonal como detecção. Todos os microfilarêmicos foram positivos no teste, nenhuma amostra CP e NE foi detectada, mas 16% dos EN foram positivos no teste (PANDEY et al., 2011).

Depois disso, os anticorpos produzidos por PANDEY e colaboradores, 2011 foram testados em outros dois estudos. No primeiro, foi descrito o método da lâmina, que baseia-se na ressuspensão do sangue contido em uma lâmina de gota espessa para análise de captura de antígenos por ELISA (VISHAL et al., 2014). Neste trabalho, das 1106 amostras testadas, houve um aumento de positividade de 7.32% quando comparado com o teste da gota espessa, revelando a existência de falsos negativos. Essa metodologia é fácil, mais barata e menos invasiva do que a coleta do sangue venoso. Tais características são ideais para inquéritos epidemiológicos a fim de avaliar populações em tratamento em massa, auxiliando o PGEFL (VISHAL et al., 2014).

O segundo utilizou os anticorpos monoclonais contra a WbSXP-1 (PANDEY et al., 2011) em conjunto com outro produzido contra uma proteína de *B. malayi*, a BmVAH (vespid allergen homologue). Essa combinação, chamada de VS, apresentou melhor reconhecimento de pacientes infectados com os dois parasitas (*B. malayi* e *W. bancrofti*), do que quando os anticorpos foram usados de forma isolada (RAVISHANKARAN et al., 2014). Assim como no presente trabalho, o ELISA sanduiche foi capaz de detectar até 15ng das proteínas recombinantes, e além disso, 100% dos infectados com *B. malayi* e *W. bancrofti* foram positivos e nenhum soro dos grupos CP, EN e NE foi identificado (RAVISHANKARAN et al., 2014).

Mais dois estudos produziram anticorpos monoclonais contra proteínas de *B. malayi* (JAWAHARLAL et al., 2014; RAVISHANKARAN et al., 2016). O primeiro conseguiu identificar pacientes infectados por *B. malayi* e *W. bancrofti* com um AcMo produzido contra a proteína proveniente da bainha microfilarial de *B. malayi*, chamada Shp-1 (JAWAHARLAL et al., 2014). Quando comparado com os testes de captura de antígenos WbSXP-1 e Og4C3, todos detectaram a MF de *W. bancrofti*, Shp-1 e WbSXP-1 a MF de *Brugia malayi* e apenas Shp-1 detectou EN (12%) e CP (29%). Esses resultados mostraram que este último teste é importante para o monitoramento do tratamento em massa, por ser capaz de identificar pacientes que entraram em contato com os parasitas (JAWAHARLAL et al., 2014). Da mesma forma, anticorpos produzidos contra a *B. malayi* Abundant Larval Transcript-2 (ALT-2) foram capazes de reconhecer 57% dos indivíduos EN negativos para MF de uma área de alta infecção filarial, enquanto BmVAH reconheceu 52% e

WbSXP-1 0% destes. O teste descrito pode ser útil para a detecção de infecções filariais recém instaladas em regiões endêmicas de países afetados pela LF (RAVISHANKARAN et al., 2016).

Em resumo, os testes ELISAs anti-Wb14 e anti-WbT mostraram sensibilidade e especificidade semelhantes ao Og4C3, POC-ICT e melhor especificidade do que o kit comercial de captura de anticorpos, o ELISA BM14. Enquanto que o ELISA sanduiche de captura do antígeno Wb14 desenvolvido mostrou ser uma opção viável para o diagnóstico da LF, pois detectou 15ng da proteína recombinante assim como um estudo que desenvolveu um teste capaz de reconhecer 100% dos MF (RAVISHANKARAN et al., 2014). A perspectiva é que este último consiga diferenciar amostras de indivíduos MF, dos grupos CP, EN e NE, como fez os testes de captura de anticorpos. Apesar dos resultados promissores com os soros de indivíduos do Brasil, estes precisam ser testados com amostras de outras filarias e vermes próximos, como *O. volvulus*, *Loa loa*, *B. malayi* e *B. timori*, para poderem ser utilizados em outros países endêmicos. Isso vai confirmar se o diagnóstico é específico para *W. bancrofti* ou existe reação cruzada com outros parasitas, além do *Strongiloides* que mostrou pequena reação, comum também no BM14 ELISA. Após essa análise, caso os resultados promissores se mantenham, esses testes desenvolvidos aqui podem ser utilizados na avaliação do PGELF.

Enquanto foram obtidos bons resultados para os testes de captura de anticorpos, o de captura de antígenos precisa seguir um caminho um pouco mais longo. Os próximos passos são purificar os anticorpos e associá-los a biotina para padronizar um teste que não contenha os interferentes presentes no meio de cultura dos hibridomas bem como no soro dos coelhos imunizados. Então, caso o teste seja capaz de identificar os indivíduos portadores de infecção ativa de LF, este deve ser analisado também com amostras de outras filarias para poder ser utilizado em outros países endêmicos, auxiliando o PGEFL.

7 CONCLUSÕES

O objetivo do estudo era produzir antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filariose Linfática. Com relação aos antígenos recombinantes e anticorpos, os resultados mostraram que o trabalho foi eficaz em produzi-los. Tratando-se do desenvolvimento dos diagnósticos, a partir das proteínas rWb14 e rWbT foi possível desenvolver dois ELISAs de captura de anticorpos que apresentaram resultados de especificidade melhores do que o teste comercial CELISA BM14, com melhor acurácia do ELISA anti-WbT em relação ao anti-Wb14. Quanto aos anticorpos produzidos contra a rWb14, estes foram capazes de detectar pequenas quantidades da proteína, em um ELISA sanduíche desenvolvido utilizando o policlonal para capturar e o monoclonal para detectar o antígeno.

Em suma, os objetivos foram atendidos, os testes de captura de anticorpos devem agora ser validados por outros grupos de pesquisa, enquanto o ELISA de captura de antígenos precisa ser primeiramente avaliado com os soros do banco do SRNF, para depois ser analisado com amostras de outros países endêmicos. Como a Filariose linfática é uma doença negligenciada e os kits de diagnóstico imunológico são importados, este trabalho contribui de forma significativa para que o Brasil seja independente tecnologicamente nesta área. Além disso, caso os resultados promissores se mantenham em avaliações futuras, os testes desenvolvidos aqui poderão ser utilizados como ferramentas para auxiliar a OMS dentro do PGEFL, verificando regiões endêmicas que estão passando pelo tratamento em massa.

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**, Londres, v. 6, n.1, p.10, Out. 2007.
- AGUIAR-SANTOS, A. M.; MEDEIROS, Z.; BONFIM, C. et al. Epidemiological assessment of neglected diseases in children: Lymphatic filariasis and soil-transmitted helminthiasis. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 250–255, Abr. 2013.
- ALCÂNTARA DE SOUZA, P. F.; BRANDÃO FERREIRA DA SILVA, E. C.; AGUIAR SANTOS, A. M. et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Atendidos No Ambulatório Do Serviço De Referência Nacional Em Filarioses Do Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-Pe. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania v. 43, n. 4, p. 427–435, jan. 2015.
- ALHASSAN, A.; LI, Z.; POOLE, C. B.; CARLOW, C. K. S. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 391–400, Maio 2015.
- ALMOND, N. M.; PARKHOUSE, R. M. The Ig distribution of anti-phosphorycholine responses in mice infected with parasitic nematodes. **Immunology**, Oxford, v. 59, p. 633–635, Dez. 1986.
- AMARAL, F. et al. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 753–757, Jun. 1994.
- BABU, S.; NUTMAN, T. B. Immunopathogenesis of lymphatic filarial disease. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 34, n. 6, p. 847–861, Out. 2012.
- BASKAR, L. K. V.; SRIKANTH, T. R.; SUBA, S.; MODY, H. C.; DESAI, P. K.; KALIRAJ, P. Development and evaluation of a rapid flow-through immuno filtration test using recombinant filarial antigen for diagnosis of brugian and bancroftian filariasis. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 48, n. 7, p. 519–25, Jul. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BURKOT, T. R.; DURRHEIM, D. N.; MELROSE, W. D.; SPEARE, R.; ICHIMORI, K. The argument for integrating vector control with multiple drug administration campaigns to ensure elimination of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**, Londres, v. 5, n. 10, p. 1-7, Ago. 2006.
- CANO, J. et al. The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, n. 1, p. 1-19, Out. 2014.

- CHANDRASHEKAR, R.; CURTIS, K. C.; RAMZY, R. M.; LIFTIS, F.; LI, B. W.; WEIL, G. J. Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 261–271, Abr. 1994.
- CHANTEAU, S.; GLAZIOU P.; MOULIA-PELAT, J. P.; PLICHART C.; LUQUIAUD P. C. J. Low positive predictive value of anti-*Brugia malayi* IgG and IgG4 serology for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 88, n. 6, p. 661–2, Nov. 1994.
- CHRISTIANA, O.; OLAJUMOKE, M; OYETUNDE, S. Lymphatic filariasis and associated morbidities in rural communities of Ogun State, Southwestern Nigeria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Philadelphia, v. 12, p. 95–101, Jan. 2014.
- DAMGAARD, J. et al. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. **Acta Tropica**, Basel, v. 161, p. 26–32, Set. 2016.
- DISSANAYAKE, S.; XU, M.; NKENFOU, C.; PIESENS, W. F. Molecular cloning and serological characterization of a *Brugia malayi* pepsin inhibitor homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 143–146, Nov. 1993.
- DONADEU, M.; LIGHTOWLERS, M. W.; FAHRION, A. S.; KESSELS, J.; ABELA-RIDDER, B. Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire. **The Weekly Epidemiological Record**, Genebra v. 3, n. 47, p. 445–452, Set. 2009.
- DREYER, G.; MATTOS, D.; NORÕES, J. Quilúria. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 460–4, Set. 2007.
- DREYER, G.; DREYER, P.; NORÕES, J. Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 43–50, Jan. 2002.
- DREYER, G.; NORÕES, J.; FIGUEREDO-SILVA, J.; PIESENS, W. F. Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: A Clinical Perspective. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 12, 544–548, Dez. 2000.
- FICORUZ. **HISTÓRIA DA FILARIOSE**. Dicionário Histórico-Biográfico das Ciências da Saúde no Brasil (1832-1930). Disponível em <<http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br/iah/pt/index.php>>. Acesso: 05 Ago. 2017.
- FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 38, p. 131–6, Mar. 2005.
- FOX, L. M. et al. Ultrasonographic examination of Haitian children with lymphatic filariasis: A longitudinal assessment in the context of antifilarial drug treatment. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore. v. 72, n. 5, p. 642–648, Maio 2005.

- FREEDMAN, D. O. et al. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. **Trop Med and Int Health**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 37–41, Jan. 2001.
- GERUSA, D.; DENISE, M.; JOSÉ, F. S.; JOAQUIM, N. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 355–362, Jan. 2009.
- GURGEL, M. F. B. C.; CARNEIRO, F.; COUTINHO, E. Ciência no século XIX: A contribuição brasileira para a descoberta do agente etiológico da filariose linfática. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 39, n. 4, p. 251–259, Out. 2010.
- HARNETT, W.; BRADLEY, J. E.; GARATE, T. Molecular and immunodiagnosis of human filarial nematode infections. **Parasitology**, London, v. 117, p. S59–71, Jul. 1998.
- ICHIMORI, K. MDA—Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and Health**, Oxford, v. 42, p. S21–S24, Jun. 2014.
- JANARDHAN, S.; PANDIARAJA, P.; PANDEY, V.; KARANDE, A.; KALIRAJ, P. Development and characterization of monoclonal antibodies against WbSXP-1 for the detection of circulating filarial antigens. **Journal of Helminthology**, Londres, v. 85, n. 1, p. 1–6, Mar. 2011.
- JANARDHAN, S. ET AL. Production, purification and diagnostic application of filarial recombinant protein WbSXP-1 expressed in salt inducible *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 34, n. 10, p. 675–683, Out. 2007.
- JAWAHARLAL, J.; MADHUMATHI, J.; PRINCE, R.; KALIRAJ, P. Repeat region of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) carries Dominant B epitopes recognized in filarial endemic population. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 3, p. 454–458, Set. 2014.
- JAWAHARLAL, J. P. et al. Evaluation of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) as a diagnostic antigen for human lymphatic filariasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 78, n. 3, p. 249–254, Mar. 2014.
- JOSEPH, H. M.; MELROSE, W. Applicability of the filter paper technique for detection of antifilarial IgG4 antibodies using the Bm14 filariasis CELISA. **Journal of Parasitology Research**, Londres, Fev. 2010.
- 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**, São Francisco, v. 6, n. 12, Dez. 2012.
- LALITHA, P. 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.**, Tokyo, v. 46, n. 5, p. 327–332, Nov. 2002.

- LAMMIE, P. J.; HIGHTOWER, A.W.; EBERHARD, M. L. The age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 51, p. 348–355, Set. 1994.
- LAMMIE, P. J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. **Filaria Journal**, Londres, v. 3, n. 1, p. 1-5, Set. 2004.
- MAIZELS, R.M.; BURKE, J.; DENHAM, D. A. Phosphorylcholine bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis in somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. **Parasite Immunol.**, Oxford, 9, 49–66, Jan. 1987.
- MARY, K.; HOTI, S. L.; KRISHNAMOORTHY, K.; DAS, P. K.; RAHMAH, N. Detection of filarial specific IgG4 antibodies in individuals residing in endemic areas using panLFRAPID test card. **Journal of Parasitic Diseases**, Nova Deli, v. 35, n. 1, p. 77–79, Jun. 2011.
- MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; MARTINS, M. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 4, p. 779–780, Jun. 2010.
- 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, Dez. 1990.
- MWAKITALU, M. E.; MALECELA, M. N.; PEDERSEN, E. M.; MOSHA, F. W.; SIMONSEN, P. E. Urban lymphatic filariasis in the metropolis of Dar es Salaam, Tanzania. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 6, n. 1, p. 1–13, Set. 2013.
- NOORDIN, R. et al. Multicentre evaluations of two new rapid IgG4 tests (WB rapid and panLF rapid) for detection of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**, Londres, v. 6, n. 9, p. 1-4, Out. 2007.
- NORÕES, J. et al. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, Londres, v. 90, p. 55–56, Jan. 1996.
- NUNES, L. V. et al. Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 6, n. 7, p. 521–526, Jul. 2016.
- NUTMAN, T. B. Insights into the pathogenesis of disease in human lymphatic filariasis. **Lymphatic Research and Biology**, Larchmont, v. 11, n. 3, p. 144–8, Set. 2013.
- OLIVEIRA, P. et al. Evaluation of diagnostic tests for *Wuchereria bancrofti* infection in Brazilian schoolchildren. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 3, p. 359–366, Maio 2014.
- OTTESEN, E. A. Editorial: The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 591–594, Set. 2000.

- PANDEY, V.; MADHUMATHI, J.; KARANDE, A. A.; KALIRAJ, P. 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, Set. 2011.
- PANDIARAJA, P.; ARUNKUMAR, C.; HOTI, S. L.; RAO, D. N.; KALIRAJ, P. Evaluation of synthetic peptides of WbSXP-1 for the diagnosis of human lymphatic filariasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 68, n. 4, p. 410–415, Dez. 2010.
- PANDIARAJA, P.; MURUGAN, V.; HOTI, S. L.; KALIRAJ, P. Molecular characterization of a truncated antigen (Wb14) of SXP-1 of *Wuchereria bancrofti* from four endemic regions in India. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 125, n. 3, p. 236–243, Jul. 2010.
- PASTOR, A. et al. Evaluation of the recombinant antigens Wb14 and WbT for the capture antibody diagnosis of lymphatic filariasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, p. e170435, Mar. 2018.
- RACHOU, R. G. Transmissores da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 267–8, Set. 1956.
- RACHOU, R. G. Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 79–100, Dez. 1957.
- RAHMAH, N. et al. A recombinant antigen-based IgG4 ELISA for the specific and sensitive detection of *Brugia malayi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 95, n. 3, p. 280–284, Maio 2001.
- RAMZY, R. et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. **Lancet**, Londres, v. 367, n. 9515, p. 992–999, Jun. 2006.
- 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, Mar. 2000.
- RAVISHANKARAN, R. et al. An evaluation of antigen capture assays for detecting active filarial antigens. **J Helminthol**, Londres, v. 89, n. 3, p. 352–358, Maio 2014.
- RAVISHANKARAN, R. et al. Evaluation of immuno diagnostic assay for the exposure of stage specific filarial infection. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 61, n. 2, p. 232–240, Mar. 2016.
- 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**, São Francisco, v. 8, n. 5, p. 3–6, Maio 2014.
- ROCHA, A. Available laboratory diagnostic methods of lymphatic filariasis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 265–270, Ago. 2000.

- ROCHA, A. et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 621–625, Jul. 2009.
- 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Recife, v. 99, n. 1, p. 101–105, Fev. 2004.
- 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**, Goiania, v. 39, n. 3, p. 233–249, Jul. 2010.
- 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, Abr. 2000.
- SILVA, B. C. E.; SILVA, L. A. M.; OLIVEIRA, S. A. P. Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial – Revisão. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 177–181, Ago. 2008.
- SIMONSEN, P. E. et al. Lymphatic filariasis control in Tanzania: Effect of repeated mass drug administration with ivermectin and albendazole on infection and transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 4, n. 6., p. e696, Jun. 2010.
- STEEL, C. et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 8, p. 1155–1161, Ago. 2013.
- 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**, Basel, v. 90, n. 3, p. 255–261, Maio 2004.
- TERHELL, A. J. Long-term follow-up of treatment with diethylcarbamazine on anti-filarial IgG4: Dosage, compliance, and differential patterns in adults and children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 33–39, Jan. 2003.
- 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**, São Francisco, v. 9, n. 7, Jul. 2014.
- WEIL, G. J. et al. Laboratory and Field Evaluation of a New Rapid Test for Detecting *Wuchereria bancrofti* Antigen in Human Blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 1, p. 11–15, Jul. 2013.
- WEIL, G. J. et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis

- employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Tropica**, Baltimore, v. 120, n. 1, p. S19–S22, Set. 2011.
- WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. R. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 78–82, Fev. 2007.
- WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitol Today**, Cambridge, v. 13, n. 10, p. 401–4, Out. 1997.
- WEILL, G. J et al. The impact of repeated rounds of mass drug-administration with diethylcarbamazine plus albendazole on bancroftian filariasis in Papua New Guinea. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 2, n. 12, Dez. 2008.
- WHO. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. **Weekly Epidemiological Record Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, Genebra, v. 39, n. 91, p. 441–460, Set. 2016.
- WONGKAMCHAI, S.; SATIMAI, W.; LOYMEK, S.; NOCHOT, H.; BOITANO, J. J. An ELISA kit with two detection modes for the diagnosis of lymphatic filariasis. **Journal of Helminthology**, Londres, v. 89, n. 5, p. 552-8, Set. 2014.
- WUCHERER, O. Notícia preliminar sobre vermes de uma espécie ainda não descrita encontrados na urina de doentes de hematúria intertropical no Brasil. **Gazeta Médica Da Bahia**, Salvador v. 3, p. 97–99, Jul. 1868.

ANEXO A – REGRAS DA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The Memórias' content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz has decided to simplify the requirements regarding the format of submitted manuscripts. From now on, all manuscripts may be submitted in any text format as long as the common subdivision of scientific articles are followed, e.g. introduction, materials and methods, results, discussion and references. For Reviews, Perspectives and similar articles, authors may use the sections that best suit the structure and content of the proposed manuscript. All manuscripts should contain, besides the title and abstract, full details of authors and institutions, acknowledgements of any technical or financial assistance as well as state any conflicts of interest. This flexible text format will be used for the initial analysis and peer review. If the manuscript is accepted, authors will be requested to edit the text in accordance with the publication style of the Memórias."

Upon acceptance, the manuscript should be arranged in the following format:

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references (must be up to 30 references), with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

Running title: not required

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Abstracts: Provide an abstract of between 250- 300 words (100 words in case of short communications, technical notes, genome announcements or reviews). Abstracts of original articles should be structured into 5 sections as follows: BACKGROUND, OBJECTIVES, METHODS,

FINDINGS and MAIN CONCLUSIONS, each section addressing respectively the problem, the aim of the study, the main methodological approach, the most important findings and the conclusions of the study.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)

[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)

[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

Author's contribution: state each author's contribution to the work.

REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from

the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. [CLICK HERE](#) [+]

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Review: Papers in “review” format are accepted only by means of invitations made by the editor or associated editors.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Genome Announcement and Highlights: this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, re-sequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

ANEXO B - CURRICULUM VITAE (LATTES)

André Filipe Pastor da Silva

Curriculum Vitae

Agosto/2017

André Filipe Pastor da Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome André Filipe Pastor da Silva
Nascimento 04/07/1987 - Recife/PE - Brasil
CPF 068.695.704-00

Formação acadêmica/titulação

2013 Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Produção de antígenos recombinantes e anticorpos para desenvolvimento de testes de diagnóstico para Filarioses Linfáticas.
Orientador: Rafael Dhalia

2009 - 2011 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: CLONAGEM DO PROMOTOR DO GENE CFH E ESTUDO DE EXPRESSÃO PARA SEUS RESPECTIVOS GENÓTIPOS (SNP C-257T): UMA ABORDAGEM ALTERNATIVA PARA O ENTENDIMENTO DA RELAÇÃO ENTRE O FATOR H E A DENGUE HEMORRÁGICA, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Laura Helena Vega Gonzales Gil / Bartolomeu Acioli Santos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2005 - 2008 Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: O Polimorfismo C-257T (gene HF1) induz altos níveis de fator H humano e protege contra a dengue hemorrágica
Orientador: Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Formação complementar

2016 - 2016 Curso de curta duração em Capacitação em propriedade intelectual e base de patentes. (Carga horária: 11h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, CPQAM-FIOCRUZ, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em I Curso Internacional em Biotecnologia de Vacinas e Antivirais.

(Carga horária: 40h).

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, CPQAM-FIOCRUZ, Brasil

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Análisis transcriptómico y proteómico de parásitos. (Carga horária: 80h).
Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, CBAB/MCTI, Brasil
Bolsista do(a): Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia
- 2010 - 2010** Advanced English (Carga horária: 145h).
Centro de Idiomas SENAC, CIS, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Fundamentos de Genética Forense. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil
- 2008 - 2008** Genome Seuquencer FLX: Nova tecnologia em sequenc. . (Carga horária: 2h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Identificação e caracterização da função gênica em. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em V Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 44h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Análise molecular e funcional de genes relacionado. (Carga horária: 44h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Técnicas avançadas de Virologia Molecular e Imunol. (Carga horária: 396h).
Departamento de Virologia e Terapia experimental - LaViTE, FIOCRUZ - PE, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Imunogenética. (Carga horária: 8h).
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Biossegurança. (Carga horária: 15h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, CPQAM-FIOCRUZ, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Introdução à Pesquisa Científica. (Carga horária: 8h).

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Genética Humana Básica. (Carga horária: 30h).
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Educação Popular Ambiental. (Carga horária: 8h).
Instituto Verde, IV, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Mini-Curso de Bonsai - Técnicas de Cultivo. (Carga horária: 12h).
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2015 - 2015** Vínculo: Professor convidado , Enquadramento funcional: Professor convidado ,
Carga horária: 2, Regime: Parcial
Outras informações:
Ministrou aula na Especialização de Medicina tropical no módulo de Dengue e Febre amarela: Resposta imune e inflamação.
- 2013 - Atual** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40,
Regime: Integral
- 2013 - 2016** Enquadramento funcional: Técnico de Laboratório/ área: biologia , Carga horária:
40, Regime: Integral

Atividades

- 08/2015 - 08/2015** Especialização
Especificação:
Módulo de Dengue e Febre amarela
- 03/2014 - 08/2014** Graduação, Psicologia
Disciplinas ministradas:
Introdução à genética humana
- 09/2013 - 02/2014** Graduação, Ciências Biológicas
Disciplinas ministradas:
Genômica e proteômica

2. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPQAM-FIOCRUZ

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

03/2013 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Departamento de Virologia e Terapia experimental - LaViTE

Linhas de pesquisa:

A Produção de Anticorpos Monoclonais para Desenvolvimento de Kits de Diagnóstico para Filariose Linfáticas

08/2008 - 12/2008 Estágio, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE

Estágio:

Iniciação científica. Estudo de polimorfismo alélico no fator h humano e sua potencial relação com o desenvolvimento da dengue hemorrágica: SNPs A2089G e G2881T. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM-FIOCRUZ - PE. Bolsista FACEPE (Renovação).

08/2007 - 07/2008 Estágio, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE

Estágio:

Iniciação científica. Estudo de polimorfismo alélico no fator h humano e sua potencial relação com o desenvolvimento da dengue hemorrágica. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM-FIOCRUZ - PE. Bolsista FACEPE. Orientadora: Laura Helena V. G. Gil

04/2007 - 04/2012 Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE

Linhas de pesquisa:

Caracterização de genes diferencialmente expressos em pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)

3. Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador, Regime: Parcial

2012 - 2013 Vínculo: Bolsista BCT-FACEPE , Enquadramento funcional: Pesquisador , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

04/2012 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Microscopia e microanálise

Linhas de pesquisa:

Silenciamento do gene de uma proteína associada ao fotoenvelhecimento.

4. Faculdade de Tecnologia Gestão e Marketing - FGM/IBGM

Vínculo institucional

2013 - 2014 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Atividades

08/2013 - 07/2014 Graduação, Fisioterapia

Disciplinas ministradas:

Patologia e Imunologia

08/2013 - 07/2014 Graduação, Enfermagem

Disciplinas ministradas:

Genética humana , Parasitologia humana

5. Instituto Federal do Sertão Pernambucano - IF-Sertão PE

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor do ensino superior , Carga horária: 3, Regime: Dedicação exclusiva

Outras informações:

Fundamentos de Biologia - Licenciatura em Química

2016 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor EBTT - Biologia , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

10/2016 - Atual Conselhos, Comissões e Consultoria, IF-Sertão-PE

Especificação:

Membro da Comissão de ética no uso de animais - CEUA

06/2016 - Atual

Ensino médio

*Especificação:**Biologia 1 , Biologia 2 , Biologia 3*

Linhas de pesquisa

1. A Produção de Anticorpos Monoclonais para Desenvolvimento de Kits de Diagnóstico para Filarioses Linfáticas
2. Caracterização de genes diferencialmente expressos em pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)

Objetivos: Validação da expressão dos genes identificados como diferencialmente expressos, via microarrays, através de QRT-PCR ; Sequenciamento e Identificação de SNPs para estabelecimento de correlação com desenvolvimento da FHD; Desenvolvimento e ferramentas de prógnóstico para o desenvolvimento da FHD utilizando genotipagem por SNPs
3. Silenciamento do gene de uma proteína associada ao fotoenvelhecimento.

Revisor de periódico

1. **Biomedicine & Pharmacotherapy -**

Vínculo

2017 - Atual

Regime: Parcial

2. **Revista Semiárido De Visu -**

Vínculo

2016 - Atual

Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ROCHA, S. W. S.; FRANCA, M. E. R.; RODRIGUES, G. B.; BARBOSA, K. P. S.; NUNES, A. K. S.; **PASTOR, A. F.**; OLIVEIRA, A. G. V.; OLIVEIRA, W. H.; LUANA, R. L. A.; PEIXOTO, C. A.

Diethylcarbamazine Reduces Chronic Inflammation and Fibrosis in Carbon Tetrachloride- (CCl₄) Induced Liver Injury in Mice. Mediators of Inflammation (Print). , v.2014, p.1 - 15, 2014.

2. **PASTOR, A. F.**; Moura, L.R.; Duarte-Neto, J.M.W.; NASCIMENTO, E. J. M.; CALZAVARA-SILVA, C. E.; GOMES, A. L. V.; SILVA, A. M.; CORDEIRO, M.; Braga-Neto, U.; Crovella, S.; GIL, L. H.; Marques, E.T.A.; Acioli-Santos, B.

Complement factor H gene (CFH) polymorphisms C-257T, G257A and haplotypes are associated with protection against Severe Dengue Phenotype, possible related with high CFH expression. Human Immunology., v.74, p.1225 - 1230, 2013.

3. **PASTOR, A. F.**; ROCHA, Emerson Antonio; BARACHO, George Sidney

Sinopse das Cactaceae epífitas ocorrentes em Pernambuco, Brasil. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. , v.10, p.10 - 12, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **PASTOR, A. F.**; ROCHA, A. C. B.; ALCANTARA, P.; GRILIS, M. R.; TENORIO, M.; RHUAMA, M.; REZENDE, A.; POMPILO, O.; Marques, E.T.A.; Dhalia, R.

DESENVOLVIMENTO DE UM KIT DIAGNÓSTICO DE CAPTURA DE ANTICORPOS PARA FILARIOSE LINFÁTICA. In: Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

ENGENE 2016. , 2016.

2. RHUAMA, M.; **PASTOR, A. F.**; ROCHA, A. C. B.; TENORIO, M.; Dhalia, R.

PRODUÇÃO E ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA ANTÍGENO DE *Wuchereria bancrofti* In: VI CONGRESSO LUSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL, 2016, Garanhuns.

VI CONGRESSO LUSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL. , 2016.

3. LEAO, M. O.; **PASTOR, A. F.**; REGO, T.; ROCHA, A. C. B.; TENORIO, M.; REZENDE, A.; POMPILO, O.; Marques, E.T.A.; Dhalia, R.

Clonagem e expressão heteróloga de antígenos recombinantes de *Wuchereria bancrofti*. In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia/ XII Congresso Latinoamericano de Parasitologia, 2015, Salvador.

Parasitologia: passado, presente e futuro.. , 2015.

4. **PASTOR, A. F.**; ROCHA, A. C. B.; LEAO, M. O.; TENORIO, M.; Dhalia, R.

Desenvolvimento de Imunodiagnósticos para filariose linfática In: V Jornada de Pós graduação em Genética UFPE, 2015, Recife.

V Jornada de Pós graduação em Genética UFPE. , 2015.

5. **PASTOR, A. F.**; ROCHA, A. C. B.; LEAO, M. O.; REGO, T.; TENORIO, M.; REZENDE, A.; POMPILIO, O.; Marques, E.T.A.; ARAUJO, J.; Dhalia, R.

Desenvolvimento de um Kit diagnóstico de captura de antígenos para Filariose linfática: infecção por *Wuchereria bancrofti* In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia/ XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia, 2015, Salvador.

Parasitologia: passado, presente e futuro.. , 2015.

6. MATOS, A. B.; **PASTOR, A. F.**; ANJOS, K. F. L.; BASTO, S. R. L.; MELO, J. V.; Dhalia, R.; MACHADO, G.; SARAIVA, K. L. A.

Development, characterization and cytotoxicity assessment of nanoparticles for siRNA encapsulation In: XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro.

XIV Brazil MRS Meeting. , 2015.

7. REGO, T.; **PASTOR, A. F.**; LEAO, M. O.; TENORIO, M.; REZENDE, A.; POMPILIO, O.; Marques, E.T.A.; GRILIS, M. R.; Dhalia, R.; ROCHA, A. C. B.

PRODUÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO PROTÉICO ORIUNDO DE VERMES ADULTOS DE *WUCHERERIA BANCROFTI* In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia/XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia, 2015, Salvador.

XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia/XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia. , 2015.

8. MATOS, A. B.; DINIZ, D. M.; **PASTOR, A. F.**; MELO, J. V.; MACHADO, G.; Dhalia, R.; SARAIVA, K. L. A.

Characterization of chitosan/alginate nanoparticles as sirna controlled delivery systems In: XIII Encontro da SBPMat, 2014, João Pessoa.

XIII Encontro da SBPMat. , 2014.

9. JACOME, R. C.; ALVARES, G. L. M.; MATOS, A. B.; MACHADO, G.; MELO, J.; **PASTOR, A. F.**; Dhalia, R.; SARAIVA, K. L. A.

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO TÓPICA DE RNA INTERFERENTE. In: 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013, Recife.

3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. , 2013.

10. MATOS, A. B.; DINIZ, D.M.; **PASTOR, A. F.**; MACHADO, G.; MELO, J. V.; SARAIVA, K. L. A.

Synthesis of nanoparticles for siRNA transfection into the skin. In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2013, Caxambu.

XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SILVA, G. C. L.; ROCHA, P. K. L.; JACOME, R. C.; ALVARES, G. L. M.; MATOS, A. B.; MACHADO, G.; MELO, J. V.; PASTOR, A. F.; Dhalia, R.; SARAIVA, K. L. A.

Characterization of PEI/siRNA polyplex against photoaging In: XIII Encontro da SBPMat, 2014, João Pessoa.

XIII Encontro da SBPMat., 2014.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. PASTOR, A. F.

Curso FIC - Preparatório para o ENEM (Biologia), 2016. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

2. PASTOR, A. F.

Produção de anticorpos monoclonais no I curso de verão em biologia celular e molecular da FIOCRUZ-PE, 2016. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

3. PASTOR, A. F.

Treinamento técnico científico sobre extração de RNA, transcrição reversa E qRT-PCR, 2013. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Maria Odete Leão. **Produção e Caracterização de hibridomas geradores de anticorpos monoclonais contra um antígeno de Wuchereria bancrofti.** 2016. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
2. Tâmisia Morais Rêgo. **Filariose linfática: novas perspectivas no diagnóstico laboratorial.** 2015. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

3. Brena Belfort Lustosa Martins. **RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS ALÉLICOS EM GENES DA IMUNIDADE INATA (OASL E STAT1) E O DESENVOLVIMENTO DA DENGUE GRAVE**. 2013. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Iniciação científica

1. Maria Odete Costa Leão. **Produção e Caracterização de hibridomas geradores de anticorpos monoclonais contra antígenos de Wuchereria bancrofti.**. 2014. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Maressa Rhuama Silva. **Produção e Caracterização de hibridomas geradores de anticorpos monoclonais contra antígenos de Wuchereria bancrofti.**. 2015. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

Orientação de outra natureza

1. Jéssica Ramires Soares de Lima. **Epidemiologia e impacto da dengue, chikungunya e zika no IFSertão-PE entre os anos de 2015 e 2017.**. 2017. Orientação de outra natureza – PIBIC Jr. (Médio técnico em Informática) - Instituto Federal do Sertão Pernambucano.