

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MICROFILARIAS DE *Wuchereria bancrofti* (FILARIIDAE):  
DIFERENCIAÇÃO IN VITRO, PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA

JANE MARY LAFAYETTE NEVES

PORTO ALEGRE - 1990

UFRGS  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
BIBLIOTECA SETORIAL  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

MICROFILARIAS DE *Wuchereria bancrofti* (FILARIIDAE):  
DIFERENCIAÇÃO IN VITRO, PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA

JANE MARY LAFAYETTE NEVES

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Genética da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul para a obtenção do grau de  
Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre - 1990

Este trabalho teve o apoio financeiro da  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-  
CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio  
Grande do Sul-FAPERGS e do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Aos meus amigos: Manoel Batista,  
Maria Zélia (meus pais) e Eduardo,  
dos quais tenho recebido duas  
formas diferentes e maravilhosas  
de amor.

## A G R A D E C I M E N T O S

A Dr<sup>ª</sup> Nance Beyer Nardi, pela confiança, segurança e orientação dadas ao longo deste trabalho, por tudo que aprendi e, principalmente por ter ensinado através de seus atos que pesquisa e humanidade podem andar juntas.

A Dr<sup>ª</sup> Gerusa Dreyer e sua equipe de trabalho em filariose, por todo o apoio recebido sem o qual este trabalho não teria sido realizado. Agradeço também pelas críticas de parte do texto e sugestões dadas.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética, através de seus professores e funcionários pela oportunidade concedida e pelo muito que aprendi. Aos meus colegas de curso também agradeço pelo interesse e agradável convivência.

A Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre por ter permitido através da chefe da disciplina de Genética, Dr<sup>ª</sup> Heirie Miriam Marques Mendez a realização da maior parte deste trabalho. A Dr<sup>ª</sup> Heirie agradeço também a oportunidade de ter conhecido a rotina de trabalho do geneticista clínico.

Aos Departamentos de Bioquímica e de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS através de seus professores, funcionários e alunos, pelo uso de equipamentos e pela maneira gentil com que sempre fui atendida.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, através de seus professores e funcionários, pelo uso de equipamentos em

algumas etapas deste estudo, bem como aos colegas que colaboraram com a minha adaptação ao laboratório quando da minha permanência no Centro no primeiro ano de curso.

A Prof<sup>ª</sup> Aida Seara Muradás por toda a orientação recebida com os experimentos em que foi utilizado material radioativo e pela disposição e interesse assumidos.

A Eduardo Gelinski Júnior, pelo carinho, incentivos e compreensão nas horas em que tivemos de abdicar de nosso lazer e pela inestimável ajuda no uso do computador.

Ao Prof<sup>º</sup> Giórgio Adriano Paskulin, pelas inúmeras trocas de idéias sobre alguns aspectos técnicos de cultivo celular.

A Dr<sup>ª</sup> Vilna de Vasconcelos Maia-Furtado, a quem devo minha formação básica em laboratório, pela obtenção de roedores provenientes do interior de Pernambuco.

A Prof<sup>ª</sup> Maria Clara Gimmler da Luz pela ajuda técnica em algumas etapas deste estudo e incentivos dados.

A Maria Júlia Vega Solana e Alexandre Christoff pela oportunidade de obter material biológico para este estudo durante coleta de roedores.

A José Ferreira dos Santos pela preocupação e amizade que sempre teve para comigo e pela ajuda na obtenção de algumas fotografias deste trabalho.

A Vilmar Manoel Vieira pelo apoio técnico na obtenção de parte das cópias fotográficas deste trabalho.

A minha família, em especial aos meus irmãos,

amigos que sempre apoiaram e incentivaram as minhas decisões.

A Mônica Waléria Pinto de Carvalho por ter sido uma das primeiras a ensinar-me os fundamentos da Genética e pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A Maria Cristina Paiva de Araújo pela simplicidade e disposição em cooperar.

Aos colegas de laboratório e demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este estudo pudesse ser desenvolvido: Marcelo A. Gonçalves, César Van Der Sand, Rogério Silbermann, Simone Stumpf, Sílvia Regina H. Volpi, Magda Cirne Lima, Zeni Zoraia A. da Silva, Elizabeth de C. Castro, Martina da Silva, Tânia Rieger, Marion Schiengold, Ricardo M. Silveira, Tamir Calcagnotto, Ana Lígia L. de Paula Ramos, Leila Dal forno, Márcia Luísa G. Tavares, Prof<sup>o</sup> Bernardo Erdtmann e Prof<sup>o</sup> Carlos Costa.

## LISTA DE TABELAS

### DO MATERIAL E METODOS

TABELA	PAG.
2.1 - Condições de cultivo de microfilárias de <b>W. bancrofti</b> a 37° C com 5 % de CO <sub>2</sub> no ar.....	56
2.2 - Condições de cultivo de microfilárias de <b>W. bancrofti</b> a 28° C, sem CO <sub>2</sub> ou a 37° C, com 5 % de CO <sub>2</sub> no ar.....	57
2.3 - Condições de cultivo de mfs. de <b>W. bancrofti</b> , em meio RPMI 1640 sem HEPES.....	58
2.4 - Características dos soros de camundongos BALB/c testados no cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias (mfs) de <b>W. bancrofti</b> .....	60
2.5 - Características dos soros humanos utilizados no cultivo <b>in vitro</b> de mfs. de <b>W. bancrofti</b> ..	61
2.6 - Imunizações de camundongos com diferentes preparações antigênicas de <b>W. bancrofti</b> .....	66
2.7 - Imunizações de camundongos com diferentes preparações antigênicas de <b>Litomosoides carinii</b> .....	67



## DOS RESULTADOS

TABELA	PAG.
3.1 - Reatividade cruzada entre antígenos de <b>W. bancrofti</b> e <b>L. carinii</b> .....	90
3.2 - Média dos soros de camundongos imunizados com diferentes doses de ovos/embriões e os respectivos desvios padrões de cada grupo em ELISA.....	91
3.3 - Condições de cultivo de microfilárias de <b>W. bancrofti</b> , em meio RPMI 1640 sem HEPES....	97
3.4 - Diferenciação de microfilárias de <b>W. bancrofti</b> durante cultivo em meio 199 completo + HEPES, em temperatura de 28°C.....	99
3.5 - Resultados do cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias de <b>W. bancrofti</b> com células de exudato peritoneal e soro imune. (em anexo).....	173
3.6 - Reação de anticorpos monoclonais anti <b>W. bancrofti</b> contra antígenos somáticos - WBS; e antígenos excretados/secretados - E/S de <b>W. bancrofti</b> e reatividade cruzada com <b>Litomosoides carinii</b> .....	111

## LISTA DE FIGURAS

### DA INTRODUÇÃO

FIGURA	PAG.
1.1 - Microfilária de <b>Wuchereria bancrofti</b> .....	06
1.2 - Ciclo evolutivo de <b>Wuchereria bancrofti</b> .....	10
1.3 - Localidades brasileiras onde foram comprovados focos de transmissão de filariose bancroftiana.	12
1.4 - Indivíduo com filariose bancroftiana.....	15
1.5 - Esquema simplificado de produção de anticorpos monoclonais .....	38

### DOS RESULTADOS

3.1 - Ovos e embriões de <b>Litomosoides carinii</b> em diferentes fases de maturação .....	85
3.2 - Ovos de <b>Litomosoides carinii</b> em diferentes fases de maturação .....	86
3.3 - <b>Litomosoides carinii</b> . Comparação entre embrião ou microrofilária e ovo em fase inicial de maturação.....	86
3.4 - Cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias. Viabilidade das culturas em meio 199, RPMI 1640 e MEM, com	

FIGURA	PAG.
ou sem complementação a 37°C.....	93
3.5 - Cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias. Viabilidade das culturas em meio 199 com ou sem complementação a 28°C e a 37°C.....	94
3.6 - Cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias. Viabilidade das culturas em meio RPMI 1640 com ou sem complementação a 28°C e a 37°C.....	95
3.7 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. Bainhas liberadas pelos parasitas.....	98
3.8 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. Estádio I .....	100
3.9 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. Estádio II .....	101
3.10 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. Estádio III .....	101
3.11 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. A e B: aspectos do Estádio IV.....	102
3.12 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. A e B: Aspectos de desembainhamento de microfilárias durante cultivo em meio 199 ou RPMI 1640 a 28°C.	103
3.13 - Diferenciação <b>in vitro</b> de microfilárias. Comparação entre os 4 tipos (I, II, III e IV) de	

FIGURA	PAG.
diferenciação do parasita durante cultivo em meio 199 ou RPMI a 28° C.....	104
3.14 - Cultivo <b>in vitro</b> de microfilárias. A e B: Aspectos de aderência de células de exudato peritoneal murino à microfilária.....	105
3.15 - Imunofluorescência na extremidade anterior e posterior de microfilária de <b>Wuchereria bancrofti</b> .....	114
3.16 - Imunofluorescência nas extremidades anteriores e posteriores de larvas de <b>Wuchereria bancrofti</b> com soro anti WBI.....	115
3.17 - Imunofluorescência com ovo de <b>Litomosoides carinii</b> com soro anti LCO/E.....	115
3.18 - Imunofluorescência com embrião de <b>Litomosoides carinii</b> com soro anti LCSA.....	116
3.19 - SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de <b>Wuchereria bancrofti</b> . WBPPT - precipitado de extrato protéico total de <b>W. bancrofti</b> .....	117
3.20 - SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de <b>Wuchereria bancrofti</b> (radiodinadas). 1 & 2 precipitado de PS; 3 & 4 - sobrenadante de PS; 5 & 6 - precipitado de IS; 7 & 8 - sobrenadante de IS.....	118

FIGURA	PAG.
3.21 - SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de <b>Wuchereria bancrofti</b> (radiodinadas). 1 - precipitado de IS; 2 & 3 - sobrenadante de IS.....	118
3.22 - Imunoprecipitação de proteínas de microfilárias de <b>Wuchereria bancrofti</b> (radiodinadas) com anti-soro anti mfs. íntegras de <b>W. bancrofti</b> e com anti-soro anti <b>Litomosoides carinii</b> (vermes adultos).....	119
3.23 - A & B - SDS - PAGE de precipitado de extrato protéico total de <b>Litomosoides carinii</b> .....	120
3.24 - SDS - PAGE de proteínas de <b>Litomosoides carinii</b> 1 a 4 extrato protéico solúvel de ovos/embriões. 5 a 8 precipitado de extrato protéico de vermes adultos.....	121
3.25 - "Western blotting" com proteínas de microfilárias de <b>Wuchereria bancrofti</b> e de vermes adultos de <b>Litomosoides carinii</b> .....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS

- aaO** - Açúcares e ácidos orgânicos
- AcMn** - Anticorpo (s) Monoclonal (is)
- Bloto** - Leite em pó desnatado diluído em tampão PBS
- CEP** - Células de exudato peritoneal
- CPqAM** - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
- DEC** - Dietilcarbamazina
- DNERu** - Departamento Nacional de Endemias Rurais
- EIR** - Ensaio imunoradiométrico
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático
- EPT** - Eosinofilia pulmonar tropical
- E/S** - Excretados (a) e/ou secretados (a)
- Fc** - Fragmento C-terminal das cadeias pesadas das imunoglobulinas
- FIA** - Fluorescência indireta com anticorpos
- FITC** - Fluoroceína - isotiocianato
- HEPES** - Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanol-sulfônico
- I(131)** - Iodo radioativo
- Ig** - Imunoglobulina
- IFAT** - Imunofluorescência indireta
- IS** - Proteínas internas e de superfície
- kDa** - Quilo Daltons
- LCO/E** - Ovos e embriões de *Litomosoides carinii*
- LCTA** - Extrato protéico total de vermes adultos de *L. carinii*

LCPPTA - Precipitado de LCTA

LCSA - Sobrenadante de LCTA

LCSE/E - Sobrenadante de extrato protéico total de ovos e embriões de *L. carinii*

mf.(s) - Microfilária (s)

NC - Nitrocelulose

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS - Tampão fosfato de sódio

PEG - Polietilenoglicol

PFi - Programa de Filariose

PM - Peso Molecular

PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto

PS - Proteínas de superfície

SCaI - Soro de camundongo imune

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SHN - Soro humano normal

SHI - Soro humano imune

SNM - Serviço Nacional da Malária

SNCa - Soro normal de camundongo

SUCAM - Superintendência de Campanhas da Saúde Pública

TID - Teste (s) de imunodiagnóstico

WBI - Microfilárias integras de *Wuchereria bancrofti*

WBT - Extrato protéico total de mfs. de *W. bancrofti*.

WBPPT - Precipitado de WBT

WBS - Sobrenadante de WBT

## S U M Á R I O

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

	PAG.
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 - Considerações Gerais</b> .....	01
<b>1.2 - <i>Wuchereria bancrofti</i></b> .....	04
1.2.1 - Classificação Taxonômica.....	04
1.2.2 - Características Gerais.....	05
1.2.3 - Distribuição Geográfica.....	11
<b>1.3 - A Filariose Bancroftiana</b> .....	13
1.3.1 - Aspectos Clínicos Gerais.....	13
1.3.2 - Diagnóstico Clínico e Tratamento.....	17
1.3.3 - Imunodiagnóstico.....	19
<b>1.4 - Caracterização Antigênica de <i>Wuchereria bancrofti</i></b> .....	21
<b>1.5 - Cultivo <i>in vitro</i> de Microfilárias de <i>Wuchereria bancrofti</i></b> .....	28
<b>1.6 - Produção de Anticorpos Monoclonais</b> .....	35
1.6.1 - Considerações Gerais.....	35
1.6.2 - Utilizações de Anticorpos Monoclonais em Filariose Animal e Humana.....	38
<b>1.7 - Caracterização de <i>Litomosoides carinii</i></b> .....	42
1.7.1 - Classificação Taxonômica.....	42
1.7.2 - Características Gerais.....	42
1.7.3 - Distribuição Geográfica.....	43
1.7.4 - Caracterização Antigênica.....	44
<b>1.8 - Objetivos</b> .....	46
<b>2 - MATERIAL E METODOS</b> .....	48
<b>2.1 - Microfilárias de <i>Wuchereria bancrofti</i></b> .....	48
2.1.1 - Coleta.....	48



2.1.2 - Isolamento.....	49
2.1.3 - Preparo do Extrato Protéico Solúvel.....	50
2.1.4 - Cultivo <i>in vitro</i> de Microfilárias.....	52
2.1.4.1 - Condições Gerais de Cultivo.....	52
a) Preparação de Placas para Cultivo com Células de Exudato Peritoneal Murino...	54
2.1.4.2 - Experimento # 1: Cultivo de Microfilárias a 37°C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar.....	55
2.1.4.3 - Experimento # 2: Cultivo de Microfilárias a 28°C sem CO <sub>2</sub> no Ar ou a 37°C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar.....	57
2.1.4.4 - Experimento # 3: Cultivo de Microfilárias a 28°C ou a 37°C sem CO <sub>2</sub> no ar ou a 37°C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar em Placas com ou sem Células de Exudato Peritoneal-CEP.....	58
2.1.4.5 - Experimento # 4: Cultivo de Microfilárias em Frascos.....	59
2.1.4.6 - Experimento # 5: Diferenciação de Micro- filárias.....	59
2.1.4.7 - Experimento # 6: Cultivo de Microfilárias com CEP em Presença de Soro Imune.....	60
2.1.4.8 - Experimento # 7: Detecção de Proteínas Ex- cretadas e/ou Secretadas-E/S por Microfi- lárias durante Cultivo <i>In Vitro</i> .....	62
<b>2.2 - Litomosoides carinii.....</b>	<b>63</b>
2.2.1 - Coleta.....	63
2.2.2 - Isolamento do Verme Adulto, Ovos e Embriões...	63
2.2.3 - Preparação do Extrato Protéico Solúvel.....	64
<b>2.3 - Imunização de Camundongos.....</b>	<b>65</b>
2.3.1 - Com Antígenos de <i>Wuchereria bancrofti</i> e de <i>Litomosoides carinii</i> .....	66
<b>2.4 - Teste Imunoenzimático - ELISA.....</b>	<b>67</b>
<b>2.5 - Imunofluorescência Indireta - IFAT.....</b>	<b>69</b>
<b>2.6 - Produção de Anticorpos Monoclonais.....</b>	<b>70</b>
2.6.1 - Obtenção de Linfócitos Imunes e Fusão Celular.	70

2.6.2 - Análise dos Hibridomas em Ensaio Imunoenzimático - ELISA.....	73
2.6.3 - Preparo de Placas de Cultura com Células de Exudato Peritoneal de Camundongo.....	75
2.6.4 - Clonagem e Subclonagem dos Hibridomas Positivos.....	76
<b>2.7 - Caracterização de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....</b>	<b>77</b>
2.7.1 - Amostras Utilizadas para a Caracterização.....	79
2.7.1.1 - Com Proteínas Radiodionadas - I (131).....	79
a) Imunoprecipitação.....	80
<b>2.8 - Transferência de Proteínas ao Papel de Nitrocelulose - Western Blotting.....</b>	<b>81</b>
<b>3 - RESULTADOS.....</b>	<b>84</b>
<b>3.1 - Parasitas Obtidos.....</b>	<b>84</b>
3.1.1 - <i>Wuchereria bancrofti</i> .....	84
3.1.2 - <i>Litomosoides carinii</i> .....	85
<b>3.2 - Verificação de Produção de Anticorpos.....</b>	<b>87</b>
3.2.1 - Contra Antígenos de <i>W. bancrofti</i> .....	87
a) Em Camundongos Imunizados.....	87
b) Em Pacientes com Filariose Bancroftiana....	88
3.2.2 - Contra Antígenos de <i>L. carinii</i> .....	89
a) Resposta Imune a Diferentes Doses de Imunização com Ovos e Embriões (O/E) de <i>L. carinii</i> .....	90
3.2.3 - Reatividade Cruzada Entre <i>W. bancrofti</i> e <i>L. carinii</i> .....	91
<b>3.3 - Cultivo In Vitro de Microfilárias.....</b>	<b>91</b>
3.3.1 - Experimento # 1: Cultivo de Microfilárias a 37° C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar.....	91
3.3.2 - Experimento # 2: Cultivo de Microfilárias a 28° C sem CO <sub>2</sub> no Ar ou a 37° C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar.....	92

3.3.3 - Experimento # 3: Cultivo de Microfilárias a 28° C ou a 37° C sem CO <sub>2</sub> no ar ou a 37° C com 5 % de CO <sub>2</sub> no Ar em Placas com ou sem Células de Exudato Peritoneal-CEP.....	96
3.3.4 - Experimento # 4: Cultivo de Microfilárias em Frascos.....	97
3.3.5 - Experimento # 5: Diferenciação de Microfilárias.....	98
3.3.6 - Experimento # 6: Cultivo de Microfilárias com CEP em Presença de Soro Imune.....	105
3.3.7 - Experimento # 7: Detecção de Proteínas Excretadas e/ou Secretadas por Microfilárias durante cultivo <i>In Vitro</i> .....	109
<b>3.4 - Produção de Anticorpos Monoclonais - AcMn.....</b>	<b>110</b>
3.4.1 - Contra Antígenos de <i>W. bancrofti</i> .....	110
3.4.2 - Contra Antígenos de <i>L. carinii</i> .....	112
<b>3.5 - Imunofluorescência Indireta.....</b>	<b>113</b>
<b>3.6 - Caracterização de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....</b>	<b>116</b>
3.6.1 - Com Antígenos de <i>Wuchereria bancrofti</i> .....	116
3.6.1.1 - Marcados com I(131).....	117
a) Imunoprecipitação.....	119
3.6.2 - Com Antígenos de <i>Litomosoides carinii</i> .....	119
<b>3.7 - "Western Blotting".....</b>	<b>121</b>
<b>4 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
4.1 - Caracterização de Antígenos Filáricos.....	123
4.2 - Cultivo <i>in vitro</i> de Microfilárias de <i>Wuchereria bancrofti</i> - Viabilidade e Diferenciação.....	144
<b>5 - RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>154</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>173</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>177</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

Dentre as doenças parasitárias típicas das regiões tropicais e subtropicais do mundo, as infecções filárias constituem um problema de saúde pública de primeira importância. E, a despeito das tentativas de controle nas áreas endêmicas, mais de cem milhões de pessoas sofrem deste mal, estando um número não inferior em risco de contrair a infecção (Maizels e cols., 1986).

Várias são as espécies de nematódeos parasitas do homem, mas três filarídeos têm merecido atenção especial por causar filariose linfática: **Wuchereria bancrofti**, **Brugia malayi** e **Brugia timori**, todas transmitidas por mosquitos. A primeira, de distribuição geográfica mais ampla, constitui o objeto do nosso estudo, por causar um grave problema de saúde pública em algumas áreas do Brasil.

No nosso País, a história da luta contra a

filariose humana e, mais especificamente, a wuchereríase ou filariose bancroftiana, em todas as áreas endêmicas ou com focos importantes da doença, não é recente. Em 1951, foi dada ao Serviço Nacional de Malária (SNM) "a tarefa de realizar estudos sobre a incidência da filariose no Brasil e de promover a devida profilaxia onde as verificações precedentes ou futuras assim o indicarem" (Rachou, 1960 p:11)

Em 1956 o SNM foi enquadrado no Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu) ficando também definido o Programa Federal de Filariose entre outras endemias igualmente importantes. Dentre as atividades imediatas da campanha contra a filariose estavam o levantamento do mapa de distribuição geográfica das filarioses humanas, através de inquéritos hemoscópicos e entomológicos, o combate à doença visando seu agente etiológico e/ou seu agente vetor, e investigações epidemiológicas e profiláticas (Rachou, 1960).

Foram então estabelecidos quais os principais focos de filariose no País, dando-se prioridade àqueles considerados como problema epidemiológico e, portanto, de combate imediato. Resultados positivos foram obtidos em diversas localidades, onde a porcentagem de portadores de microfilárias (estágio embrionário de **W. bancrofti**) no sangue era baixa em relação ao número de habitantes da área. Os esforços concentraram-se principalmente na luta antivetorial e administração de drogas aos indivíduos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENETICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MICROFILARIAS DE *Wuchereria bancrofti* (FILARIIDAE):  
DIFERENCIAÇÃO IN VITRO, PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ANTIGENICA

JANE MARY LAFAYETTE NEVES

PORTO ALEGRE - 1990

infectados, visando eliminar o agente etiológico.

Uma revisão do que já se fez para o combate da filariose no Brasil, fugiria um pouco do escopo deste trabalho. Entretanto, verificaremos no decorrer do mesmo, alguns pontos relevantes e que responderão pelo menos em parte por que, apesar dos esforços realizados contra as infecções filáricas de modo geral, não tem sido possível obter resultados favoráveis no que concerne à erradicação desse mal, mesmo quando muitas outras doenças de igual magnitude estão desaparecendo.

Se verificarmos o extenso e bem definido Programa contra a filariose, desde quando foi elaborado, poderíamos concluir que a doença já não causa maiores preocupações para a população e órgãos responsáveis pelo controle de endemias. Porém, não podemos esquecer que qualquer programa de controle de endemias terá pouco sucesso se também um programa de educação sanitária já não estiver bem definido e conhecido pela população. Assim a situação nas áreas endêmicas persiste.

Em Recife-PE (área endêmica de filariose bancroftiana), apesar de campanhas de saúde realizadas pela Superintendência de Campanhas da Saúde Pública (SUCAM), nos últimos cinco anos não se tem realizado pesquisas epidemiológicas de controle da filariose.

O atual Programa de Filariose estabelecido em 1986, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-

FIOCRUZ-Recife-PE), que tem como objetivo promover as condições necessárias para pesquisa básica e aplicada em filariose bancroftiana e animal que ocorrem naquela região, vem dando um novo impulso para o controle da doença naquele Estado (Dreyer, 1987).

Além da **W. bancrofti**, foi também estudado neste trabalho um outro filarídeo, **Litomosoides carinii**, que parasita algumas espécies de ratos silvestres. O grau de semelhança genética entre estes dois nematódeos, medido por métodos imunológicos, evidencia-se bastante alto.

## 1.2 **Wuchereria bancrofti**

### 1.2.1 Classificação Taxonômica

Os nematelmintos são animais metazoários com simetria bilateral. Subdividem-se em duas classes, Nemathomorpha e Nematoda, sendo esta última a que engloba os parasitas cuja cavidade geral não se acha revestida de epitélio. São fusiformes ou filiformes, com tubo digestivo completo, sexos separados e, de modo geral, apresentando dimorfismo sexual (Pessôa e Martins, 1982).

O verme **W. bancrofti** pode ser assim situado:

PHILUM: Nemathelminthes

CLASSE: Nematoda

ORDEM: Filariidea - Yamaguti, 1961

SUPERFAMILIA: Filarioidea



FAMILIA: Filaridae - Clauss, 1885

SUBFAMILIA: Filarinae

GENERO: *Wuchereria* - Silva Araújo, 1877

ESPECIE: *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877)

### 1.2.2 Características Gerais

Este filarídeo teve sua forma jovem ou embrionária, a microfilaria (mf.), descoberta por Wucherer em 1876 e Lewis em 1886 (Acton e Rao, 1933). Possui corpo opalino, transparente com tegumento liso e adelgado nas duas extremidades. A fêmea adulta apresenta cerca de 66 a 100 mm de comprimento e 185 a 280 um de largura com a extremidade caudal terminando abruptamente. O macho mede de 25 a 39 mm de comprimento e 90 a 120 um de largura com a extremidade posterior enrolada ventralmente (Pessôa e Martins, 1982).

**Características Morfo-Histológicas das Microfilárias** - Nas microfilarias (mfs.) coradas, visualiza-se uma membrana transparente, a bainha, que envolve o corpo da mf. e que se estende além das duas extremidades. Abaixo da cutícula, que aparece à luz do microscópio como uma densa linha, dispõe-se uma série de células alongadas, as células subcuticulares, as quais irão formar o sistema muscular da filária. Ao longo do corpo, no seu interior, evidencia-se com as técnicas convencionais de coloração (Giemsa ou hematoxilina-eosina) (Figura 1.1) uma série grande de núcleos celulares,

denominada coluna de núcleos somáticos, que posteriormente formará o tubo digestivo (Simpson e Laurence, 1972).

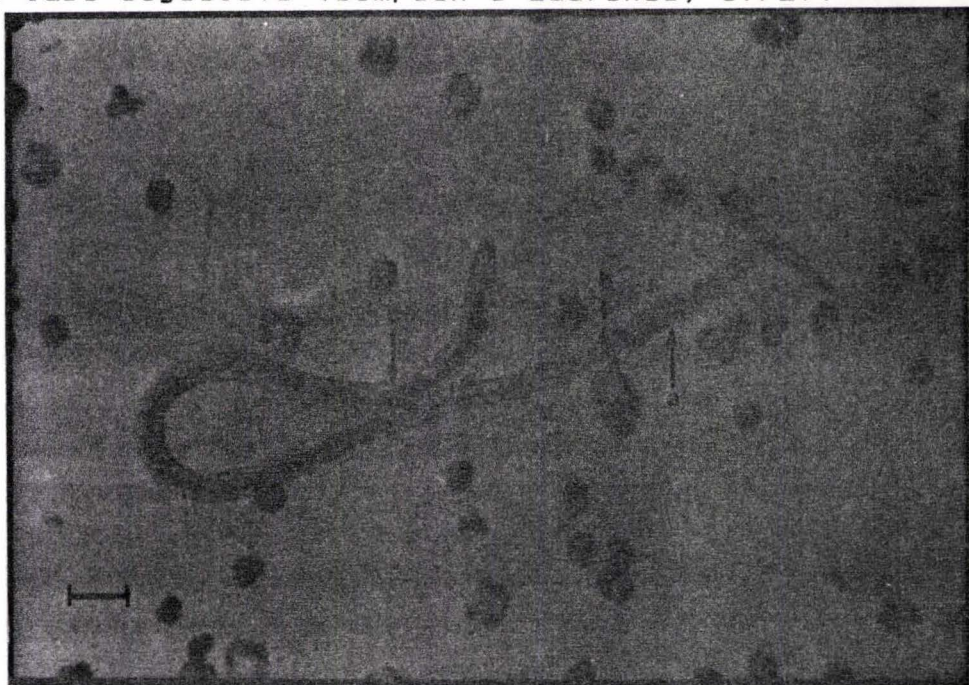


Figura 1.1 Microfilária de **Wuchereria bancrofti** corada com hematoxilina - eosina. Em a) bainha ; b) cutícula; c) coluna de núcleos somáticos. (Fotografia cedida por L.D. de Andrade, CPqAM-Recife-PE).

Entre o término dos referidos núcleos e a porção anterior bem como a posterior, existe um espaço denominado de espaço cefálico e espaço caudal respectivamente. A microscopia eletrônica mostra no entanto que os "espaços" possuem músculos necessários a outras estruturas vitais do helminto (Simpson e Laurence, 1972).

Coloração para ácidos nucleicos demonstrou a presença de dois tipos celulares nas microfilárias. As células da coluna nuclear são ricas em ácido desoxirribonucleico enquanto as células excretoras e as células R ou células retais, que têm núcleo vacuolado e um

nucléolo, são ricas em ácido ribonucleico (Feng, 1933; Simpson e Laurence, 1972).

**Habitat e Hábitos** - São parasitas do sistema sanguíneo e linfático, comprometendo ainda o tecido conjuntivo, tecido muscular e cavidades serosas. Os dois sexos vivem em geral juntos (Pessôa e Martins, 1982).

Os vermes adultos habitam o sistema linfático (vasos e linfonodos), por vários anos. As fêmeas, ovovivíparas, liberam constantemente grande número de formas embrionárias (200 a 250  $\mu$ m de comprimento) que caem na circulação sanguínea (Dreyer e Coutinho, 1989).

As microfilárias, que durante o dia concentram-se nos capilares mais profundos, principalmente nos pulmões, distribuem-se à noite nos vasos superficiais (Hawking e Thurston, 1951; Kawaski, 1958).

Na verdade a migração não ocorre ativamente entre os pulmões e o sangue periférico, mas sim passivamente pela circulação do sangue a cada minuto. No entanto, as mfs. tendem a se acumular durante o dia nos capilares dos pulmões e seu número no sangue periférico diminui. A cada período de acumulação, mais mfs. entram nos pulmões que as que saem. (Hawking, 1967).

Segundo estudos de Hawking (1967) a periodicidade noturna das mfs. de **W. bancrofti** constitui-se num ritmo circadiano e a explicação de como a acumulação de mfs. nos pulmões é modificada para "realizar" um ritmo de 24 horas,

complica-se pelo fato de que diferentes espécies de mfs. respondem a estímulos em diferentes caminhos.

O autor acima afirma ainda que, entre os fatores que influenciam a periodicidade das mfs. de **W. bancrofti** está a diferença na tensão de oxigênio (barreira do oxigênio), que é mais baixa à noite (40 mmHg) que no dia (55 mmHg).

Sendo assim observam-se duas fases do ciclo, uma fase passiva, pela noite, e uma outra ativa durante o dia (Hawking, 1967, 1975).

**Transmissão da microfilária e Ciclo Evolutivo** - Sendo um verme heteroxeno, a **W. bancrofti** necessita de dois hospedeiros para que se complete seu ciclo evolutivo: um hospedeiro intermediário e vetor, invertebrado, e um hospedeiro definitivo, vertebrado. O homem, até o presente, é o único hospedeiro definitivo conhecido para este parasita.

A periodicidade das mfs. de **W. bancrofti**, observada por Manson, levou-o também à descoberta, no ano seguinte (1879) do agente transmissor, um mosquito do gênero **Culex** (Acton e Rao, 1933; Hawking, 1967).

A espécie **Culex quinquefasciatus** conhecida no Brasil como pernilongo, muriçoca ou carapanã, é comprovadamente o principal vetor da **W. bancrofti**; entretanto em investigações realizadas (Rachou e cols., 1955) larvas daquele parasita foram encontradas em outros mosquitos,

tais como **Aedes** e **Anopheles**.

Devido à importância do **Culex quinquefasciatus** na transmissão da filariose bancroftiana, alguns aspectos de seu comportamento biológico precisam ser descritos. Assim, as fêmeas deste mosquito cosmopolita apresentam acentuada hematofagia noturna, permitindo que as mfs. durante a sua fase passiva, no hospedeiro definitivo, sejam sugadas no momento da picada do inseto.

Os criadouros de **C. quinquefasciatus** são os mais variados tipos de coleções de água doce, principalmente aquelas com alto teor de matéria orgânica. No ambiente aquático desenvolvem-se as formas imaturas (larvas e pupas) e na fase de vida aérea (alados) são mosquitos de hábitos domiciliários. O mosquito infesta-se ao picar um homem que apresente mfs. em seu sangue periférico. Após sua ingestão, as mfs. chegam ao estômago do mosquito onde perdem suas bainhas. Transcorridas 24 horas, estas larvas de primeiro estágio migram do estômago para os músculos torácicos. As larvas tornam-se cada vez mais curtas e largas até atingirem formato de "salsicha". Depois voltam a crescer, sofrem uma muda e são ditas larvas pré-infectantes. São maiores, com tubo digestivo completo e 3 a 4 papilas caudais. As larvas agora móveis, atingem a cavidade geral do mosquito, sofrem nova muda e passam a ser larvas infectantes. Sendo agora mais móveis migram principalmente para o lábio inferior do mosquito ou bainha da probóscida. Ao picar o homem, o

mosquito libera as larvas por rompimento da bainha e estas penetram ativamente através da pele sã ou ao redor da picada, ou por entre a solução de continuidade da pele no ponto da picada. As larvas atingem os vasos linfáticos tornam-se sexualmente maduras e posteriormente dão origem a embriões (mfs.) que invadem de novo a corrente sanguínea (Pessôa e Martins, 1982) (Figura 1.2). Atualmente, a forma de como ocorre a penetração da larva no hospedeiro definitivo tem sido motivo de discussão e controvérsias (Gerusa Dreyer, comunicação pessoal).

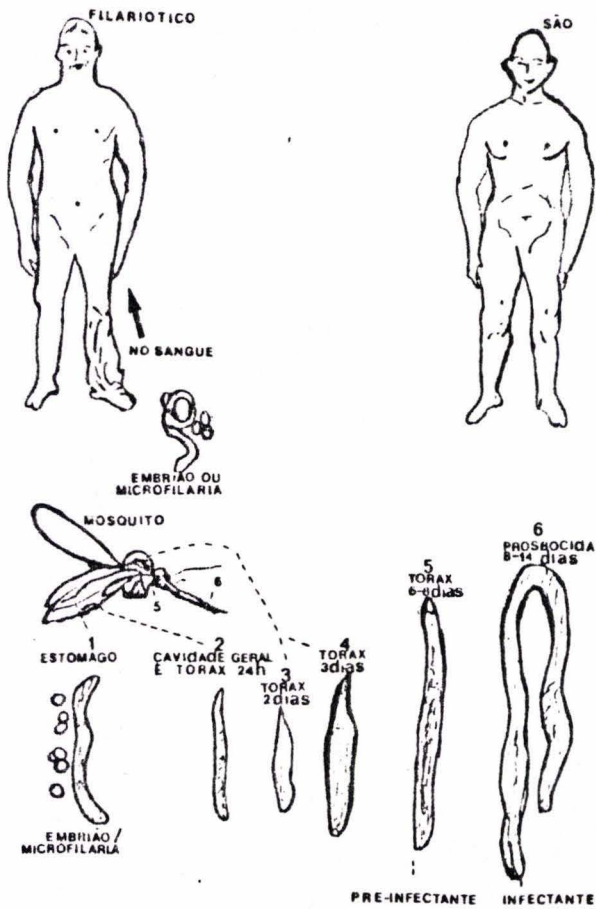


Figura 1.2 Ciclo evolutivo de *Wuchereria bancrofti*.  
Fonte: Pessôa e Martins, 1982.

### 1.2.3 Distribuição Geográfica

A filariose linfática atinge um amplo espectro em todo o mundo, onde três partes do total estimado estão na China, Índia e Indonésia (Ásia Sudoriental). As demais concentram-se em muitos países da África, das Américas, regiões do Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental (OMS, 1984).

A *Wuchereria bancrofti* distribue-se na maior parte dos países situados na zona tropical e subtropical onde espécies de mosquitos que são vetores potenciais se encontram. As áreas endêmicas limitam-se às regiões onde determinadas condições favorecem sua transmissão, em geral regiões quentes e úmidas. As estimativas relativas ao número de pessoas infectadas são de cerca de 90 milhões (OMS, 1984).

No Brasil, de acordo com os inquéritos hemoscópicos e entomológicos realizados entre 1951-1958 pelo DNERu, onze localidades eram focos comprovados de filariose bancroftiana (Rachou, 1960) (Figura 1.3).

O foco de Manaus foi considerado de pouca importância; entretanto, até 1978, o *Culex quinquefasciatus* apresentava-se como um vetor potencial para a transmissão da filariose bancroftiana, segundo dados de Charlwood (1979).

Atualmente os focos de *W. bancrofti* considerados de real importância médico-sanitária são Belém-PA e Recife-PE.

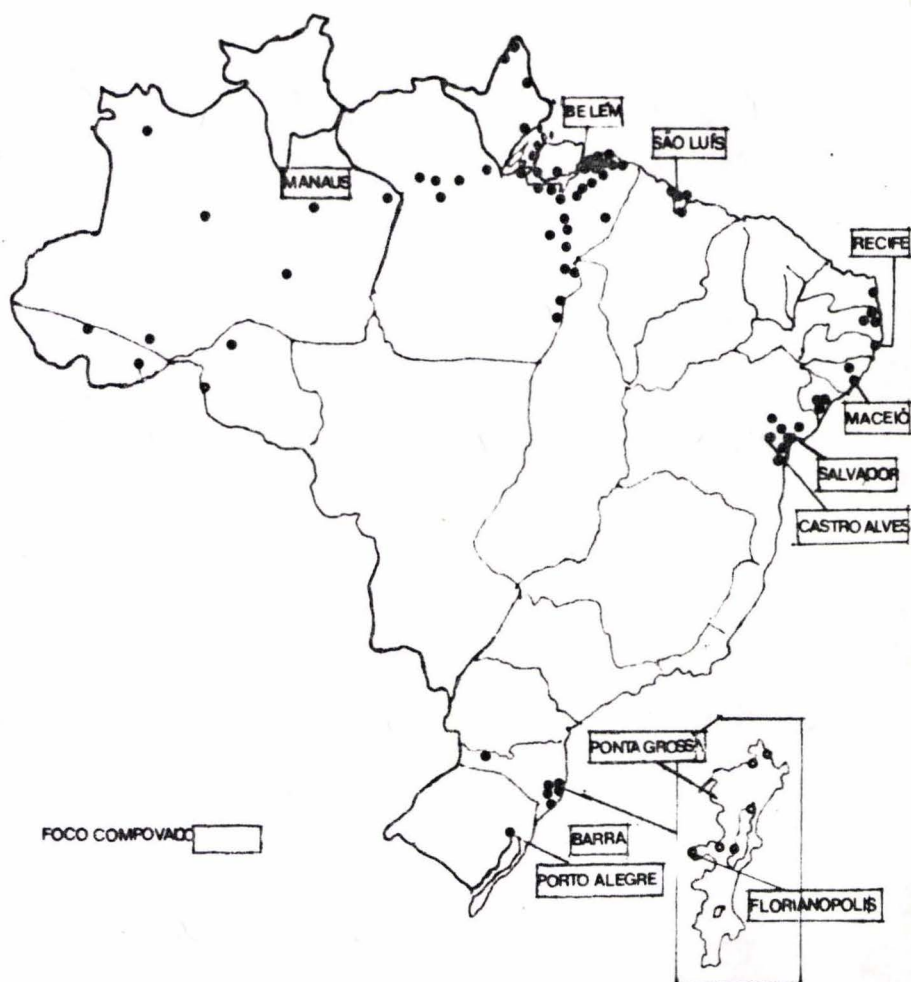


Figura 1.3 - Localidades brasileiras onde foram comprovados focos de transmissão de filariose bancroftiana de acordo com inquérito realizado de 1951-1958 pelo DNERu. Fonte: Rachou, 1960.

Inquéritos atuais feitos pelo grupo de trabalho em filariose do CPqAM-Recife-PE, revelam um alto índice de microfilaremia (porcentagem de indivíduos com mfs. no sangue) em várias áreas da região metropolitana de Recife e na cidade vizinha Olinda (Gerusa Dreyer, comunicação pessoal).

As medidas de combate à filariose no Estado de Santa Catarina, em Florianópolis (faixa litorânea e zona



urbana) e Laguna (Barra), principais focos de transmissão do parasita, foram direcionadas ao tratamento dos doentes e eliminação do mosquito vetor.

Inquérito hemoscópico, de controle para pesquisa de mfs., realizado em 1976 pela SUCAM, naquelas regiões, não revelou qualquer exame positivo. Em Porto Alegre, foco mais meridional do mundo e onde a filariose era estacional e de baixa incidência, a eliminação dos parasitas tornou-se mais fácil pela diminuição espontânea da prevalência, associada às condições climáticas locais e luta contra os mosquitos (Schlemper Jr. e Ferreira Neto, 1985).

### **1.3 A Filariose Bancroftiana**

#### **1.3.1 Aspectos Clínicos Gerais**

A filariose bancroftiana é a infecção causada pelo verme **Wuchereria bancrofti** apresentando um amplo espectro clínico, podendo se iniciar com crises de linfangites e linfadenites, periódicas ou intermitentes.

Com a evolução da doença, pode ocorrer a cronicidade do processo, levando à linfangiectasia, à elefantíase (deformação por hipertrofia do tecido conjuntivo) ou quilúria, entre outras manifestações clínicas (Gerusa Dreyer, comunicação pessoal).

Dreyer e Coutinho (1989) sugerem uma classificação da filariose linfática bancroftiana adaptada de outros pesquisadores e aceita pelos peritos da OMS:

### **1 - Indivíduos endêmicos "normais"**

Compreende todos os indivíduos residentes na área endêmica, sem sintomatologia filariótica e amicrofilarêmicos ("negativos endêmicos").

### **2 - Indivíduos assintomáticos com microfilaremia**

Compreende todos os indivíduos com microfilaremia e assintomáticos do ponto de vista filarial.

### **3 - Pacientes com manifestações agudas**

A sintomatologia desta fase inclui episódios de febre, linfangite retrógrada, linfadenite localizada nos membros inferiores ou superiores e manifestações na genitália masculina do tipo orquite, epididimite ou funiculite. A presença de microfilárias circulantes pode ser positiva em 40% a 50% dos casos, enquanto a sorologia apresenta-se variável.

### **4 - Pacientes com manifestações crônicas**

É o grupo mais importante do ponto de vista clínico e patológico, por apresentar lesões irreversíveis. A mais conhecida, por seu aspecto deformante e anti-estético, é a elefantíase, localizada geralmente nos membros inferiores, ocupando toda a perna (Figura 1.4).

A frequente ausência de mfs. no sangue de indivíduos com elefantíase, ainda é um fato não entendido pelos estudiosos como já afirmavam Acton e Rao (1933), bem como os autores da classificação aqui descrita, sendo levado em consideração o provável envolvimento de mecanismo

imunológico.



Figura 1.4 - Indivíduo com filariose bancroftiana apresentando elefantíase no membro inferior. Fotografia cedida pelo grupo de trabalho em filariose do CPqAM-FIOCRUZ-Recife (PE).

#### 5 - Eosinofilia pulmonar tropical (EPT)

Os indivíduos deste grupo não apresentam mfs. no sangue e têm alto título de anticorpos contra o parasita, verificado quando da utilização de antígenos homólogos ou heterólogos. Apresentam assim um estado de hipereatividade imunológica nesta síndrome, devido a uma resposta anômala de alguns indivíduos, possivelmente predispostos geneticamente a antígenos filáricos que comumente estão sendo expostos ao homem.

Muitos indivíduos com EPT apresentam ainda aumento de IgE no soro, infiltração pulmonar, dificuldade para respirar e tosse noturna (Ottesen e cols., 1979).

#### 6 - Pacientes com formas frustas ou controversas

Neste grupo foram incluídos sub-grupos de forma a abranger tanto pacientes com sintomatologia frusta ou atípica das formas descritas anteriormente, quanto doentes com manifestações clínicas possivelmente relacionadas com a filariose, pelo menos em uma certa porcentagem dos mesmos ou em fase determinada da evolução da doença.

Sub-grupos:

- a - Hipertrofia ganglionar;
- b - Tosse crônica ou síndrome asmátiforme (sem quadro típico de EPT);
- c - Hipereosinofilia isolada;
- d - Hematúria (glomerulonefrite?);
- e - Artrite reativa;
- f - Endocardiofibrose;
- g - Outros.

Segundo Acton e Rao (1933), os produtos tóxicos excretados pelo verme adulto, resultantes do seu metabolismo, podem levar à produção de sintomas alérgicos.

As filárias adultas ou imaturas nos linfáticos, podem causar reações do sistema fagocítico que visam a destruição dos parasitas. Os quadros clínicos estão portanto

relacionados aos fenômenos inflamatórios obstrutivos e alérgicos.

Pode-se de uma maneira geral mas não conclusiva, afirmar que qualquer condição que seja capaz de produzir obstrução do sistema linfático leva a sintomas semelhantes aos de uma infecção filárica, sendo a susceptibilidade de cada individuo um fator a ser considerado.

Em oposição a alguns investigadores, Acton e Rao (1929, 1933) apontam a partir dos seus estudos que enquanto a **W. bancrofti** é primariamente responsável pelos danos ao sistema linfático, as condições patológicas na maioria dos casos são devidas à infecção bacteriana secundária. Os autores acima demonstraram ainda que há produção de uma toxina pela fêmea adulta.

### **1.3.2 Diagnóstico Clínico e Tratamento**

No diagnóstico de filariose a coleta de sangue ou urina (nos casos de quilúria) para pesquisa de mfs. é a etapa inicial, sendo preferencialmente feita no horário compatível com o pico de microfilaremia de cada região.

No entanto este horário nem sempre é compatível com os trabalhos rotineiros de campo, de modo que a coleta de sangue em grande escala nas áreas endêmicas, onde a periodicidade é noturna, se realizada pelos órgãos de controle de endemias é em geral feita no início da noite. Neste período o número de pessoas em que se detecta

parasitemia não representa o verdadeiro índice de infecção da população em estudo.

Para pesquisa de mfs. no sangue periférico, utiliza-se o método da gota espessa, com sangue obtido da polpa digital, que é posto em lâmina de microscopia e corado com corante de Giemsa. Nos casos onde não se detecta parasitemia, não se exclui o diagnóstico de filariose, e outros exames adicionais devem ser feitos para melhor definir o quadro clínico (Dreyer, 1987).

**Tratamento** - Desde a sua síntese em 1947 por Hewit e cols. (Hawking e cols, 1950, Srivastava e Prasad, 1970), a Dietilcarbamazina-DEC, um derivado da Piperazina, é a droga de escolha no tratamento da filariose tanto humana quanto de animais. É administrada na dose de 2 a 6 mg/kg de peso de acordo com o quadro clínico de cada paciente. Estudos do efeito *in vitro* da DEC demonstraram que não existe ação antifilárica significativa. *In vivo* ela causa o desaparecimento rápido de microfilárias no sangue, tem um leve efeito em adultos e nenhuma ação em estágios de desenvolvimento no mosquito (Hawking e cols., 1950). Esses autores concluíram ainda que *in vivo* a DEC causa modificações nas mfs., que vão se acumulando no fígado, sendo então destruídas por fagócitos do sistema retículo endotelial.

Em Florianópolis-SC, a DEC foi usada como medida

profilática e de combate. Assim, após minuciosos inquéritos epidemiológicos, foram administradas doses de 6 mg/kg de peso por via oral em indivíduos afetados (Ponta Grossa) e em indivíduos afetados ou não (Laguna), fazendo com que de 1953 a 1957 o índice de microfilárias caísse consideravelmente, bem como o índice de infestação do **Culex quinquefasciatus**. Esses resultados levaram à adoção de administração da DEC como única medida profilática de combate à filariose, o que causou após vários tratamentos sucessivos a erradicação da doença em Santa Catarina (Schlemper Jr. e Ferreira Neto, 1985).

### 1.3.3 Imunodiagnóstico

A natureza periódica da microfilária, variações quantitativas de parasitemia e dificuldades para coleta de sangue em grande escala são alguns dos inconvenientes ao diagnóstico parasitológico.

A utilização e aperfeiçoamento de testes de imunodiagnóstico-TID, para diagnóstico precoce de infecções filárias tornam-se cada vez mais necessários e urgentes. Além do mais, a filariose desenvolve-se por um período de tempo longo, caracterizando-se por um grande espectro de respostas do organismo, tais como manifestações alérgicas, que refletem a importância do fenômeno imunológico que os parasitas causam (Ambroise-Thomas, 1974).

Enfatizando ainda o estudo de parasitas

relacionados e a sua utilização em testes de reatividades cruzadas, estes têm proporcionado uma alternativa para auxiliar no imunodiagnóstico de filariose, embora não seja a solução ideal, contornando a falta de antígenos parasitários específicos. Assim, devido a uma maior disponibilidade muitos estudos têm sido feitos com parasitas relacionados à *W. bancrofti*, visando explorar o potencial imunodiagnóstico de antígenos filáricos heterólogos isolados de *Litomosoides carinii*, *Onchocerca volvulus*, *Dirofilaria immitis*, *Brugia malayi*, *Setaria digitata* e outras espécies (Culbertson e cols., 1944; Kaliraj e cols., 1979; Grove e Davis, 1978; Dissanayake e Ismail, 1980a).

Se a reatividade cruzada permite o uso de heteroantígenos, constitui-se também numa limitação sorológica do TID. Problemas como pouca sensibilidade, reatividade cruzada com outros nematódeos e baixa correlação de respostas sorológicas com intensidade de infecção, ainda persistem (Dissanayake e Ismail, 1980b).

Dentre os TID que já foram mais utilizados e os que ainda hoje são empregados, temos o teste intradérmico, Imunodifusão em Gel, Teste de Hemaglutinação Indireta, Reação de Fixação do Complemento (muito usado por um longo tempo) (Kagan, 1963), Teste de Precipitação, Imunoeletroforese, Ensaio Imunoenzimático-ELISA, Ensaio Imunoradiométrico-EIR, Fluorescência Indireta com Anticorpos-FIA (Ambroise-Thomas, 1974; Hamilton e cols.,



1984; Kaliraj e cols., 1981b; Lobos e Weiss, 1986). Em geral, estes testes visam a detecção de anticorpos antifiláricos no soro dos pacientes.

Apesar do grande número de TID que se pode utilizar, a maioria não preenche todos os requisitos necessários para uso de rotina tais como, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade etc.. Além disso, a pouca disponibilidade de antígenos filáricos puros impede o desenvolvimento de um TID específico, bem como um maior conhecimento da química de antígenos filáricos.

O grau de especificidade, que está na dependência da pureza do antígeno empregado, é o mais importante critério para seleção de um bom teste de imunodiagnóstico.

Estudos comparativos têm revelado que o FIA é bastante sensível, principalmente quando se usa antígeno somático homólogo, mas requer equipamento sofisticado e, para testes em grande escala, torna-se de rotina exaustiva (Kaliraj e cols., 1979). Para o FIA, antígenos de superfície de microfilárias intactas não podem ser usados para detectar microfilaremia a menos que a superfície da microfilária seja tratada com enzimas (Gonzaga dos Santos e cols., 1976).

#### **1.4 Caracterização Antigênica de *Wuchereria bancrofti***

A caracterização antigênica de parasitas constitui-se em um dos melhores exemplos do emprego de métodos imunológicos na análise genética de organismos.

Apesar de serem estruturalmente simples, os nematódeos apresentam-se bem diferenciados quanto aos vários tecidos que os compõem. Três tipos principais de proteínas podem ser distinguidos de acordo com a sua localização:

- (a) Proteínas de superfície, ancoradas à bainha do parasita,
- (b) Proteínas somáticas, analisadas em extratos solúveis preparados por homogeneização do parasita,
- (c) Proteínas de excreção e/ou secreção (E/S), obtidas por cultivo *in vitro* dos parasitas e coleta do meio de cultura ou a partir do sangue de indivíduos infectados.

Uma mesma proteína pode estar presente em mais de um tecido, revelando uma possível ativação gênica diferencial. Estes estudos podem portanto, fornecer informações sobre a atividade gênica geral nos parasitas. Uma comparação do padrão de proteínas em diferentes espécies ou gêneros pode ainda indicar qual a proximidade genética e portanto, a relação evolutiva entre ambos.

Este padrão de proteínas é analisado através de métodos de fracionamento como a eletroforese. Mais comumente porém, métodos imunológicos são empregados, devido a sua sensibilidade. Estes métodos envolvem basicamente, as seguintes etapas:

- (a) Isolamento das proteínas a serem estudadas -

extração das proteínas de membrana com auxílio de detergentes, preparo de extratos solúveis com as proteínas somáticas. Para a coleta de proteínas excretadas e/ou secretadas, obtem-se a partir do cultivo *in vitro* de parasitas,

- (b) Preparo de anti-soros contra estas proteínas por imunização de animais de laboratório (camundongos, ratos ou coelhos, por exemplo) e coleta do soro;
- (c) Emprego dos anti-soros para a caracterização das proteínas por eles reconhecidas. Vários testes podem ser empregados com esta finalidade, tais como Imunodifusão em Gel, Imunoeletroforese, Ensaio Imunoenzimático-ELISA, Western Blotting e Imunofluorescência.

A escolha do teste baseia-se principalmente no tipo de proteína a ser analisada; por exemplo, Elisa é utilizado para estudo de proteínas somáticas ou E/S, enquanto a Imunofluorescência emprega-se na detecção de proteínas de superfície.

Dois pontos devem ser aqui salientados. Em primeiro lugar, devido ao fato de que estas proteínas são analisadas em geral por métodos imunológicos, são mais comumente referidas como antígenos parasitários, termo que será adotado neste texto.

Quando a mesma proteína ocorre em parasitas

geneticamente diferentes, isto é, quando o mesmo anticorpo dá um resultado positivo na análise dos parasitas, diz-se que existe uma reatividade cruzada entre estes antígenos.

Em segundo lugar, nestes estudos estão sendo cada vez mais empregados anticorpos monoclonais em substituição aos anti-soros convencionalmente produzidos.

Assim, desde o desenvolvimento por Köhler e Misltein (1975), da tecnologia de hibridoma para a produção de anticorpo monoclonal, os pesquisadores estão livres das dificuldades encontradas com o uso de soros policlonais (soros com diferentes anticorpos e especificidades).

A imortalidade das linhagens dos hibridomas asseguram a monoclonalidade e especificidade, além da disponibilidade permanente de seus produtos, os anticorpos (Kaplan e cols., 1982).

A caracterização de antígenos é portanto, ponto crucial em estudos que visam ao conhecimento do parasita, suas interações com o hospedeiro e ao diagnóstico e tratamento das doenças parasitárias. No entanto, quando se trata de antígenos filáricos torna-se difícil a obtenção de vermes adultos ou extrato cru de mfs., livres de proteínas do hospedeiro.

Devido à reatividade cruzada entre espécies de filárias, heteroantígenos (isto é, proteínas obtidas de uma outra espécie) têm sido utilizados como alternativa para a produção de anticorpos destinados ao estudo da *W. bancrofti*.

Diversos vermes relacionados, tais como *Dirofilaria*

**immitis** (filária do cão), **Onchocerca volvulus**, **Litomosoides carinii** (filária do rato), **Loa loa**, **Setaria digitata** (filária bovina), espécies de **Dipetalonema**, e espécies de **Brugia**, são utilizadas como fontes de antígenos (Philipp e Davis, 1986; Lobos e Weiss, 1986; Culbertson e cols., 1944; Prüsse e cols., 1982; Dissanayake e Ismail, 1980a; Lal e cols., 1987).

Antígenos parasitários têm sido estudados principalmente em **Brugia malayi** e **B. pahangi**, tanto com soro policlonal quanto com anticorpos monoclonais (ver 1.6.2).

Foram detectados antígenos presentes na superfície dos vermes adultos (Sutanto e cols., 1985) ou secretados em cultura **in vitro** de microfilárias (Maizels e cols., 1985), bem como antígenos estágio-específicos e não específicos (Tomisato e cols., 1986). Os antígenos indutores de anticorpos protetores foram identificados, sendo o mais importante uma proteína de peso molecular (PM) = 25 kDa (Kazura e cols., 1986a,b).

Com relação à **W. bancrofti**, é praticamente impossível obter-se vermes adultos em quantidade suficiente para a extração de antígenos. Quanto às mfs. são, em geral, obtidas a partir de amostras de sangue de vários indivíduos, o que limita a análise antigênica do parasita em maior escala.

O estágio de microfilária ainda é o mais disponível e algumas tentativas de caracterização do complexo

antigênico desse parasita já foram registradas. Como exemplo a análise de proteínas antigênicas de mfs. e larvas infectantes de *W. bancrofti* permitiu a identificação de dois antígenos principais (PM = 17 e 21 kDa) ocorrendo em ambos os estádios (Maizels e cols., 1986).

Com a finalidade de obtenção de uma maior quantidade de material antigênico, tentativas de infecção experimental têm sido feitas. Assim, Palmieri e cols. (1982) recuperaram vermes adultos de *W. bancrofti* em macacos (*Presbytis cristatus* - Eschscholtz, 1921) experimentalmente infectados com larvas infectantes. *Presbytis cristatus* é naturalmente infectada por uma espécie nova, a *Wuchereria kalimantani* sp. n. (Palmieri e cols., 1980) e, como os autores acima afirmam, infecções naturais de *W. bancrofti* são hospedeiro-específicas para o homem e o desenvolvimento de infecções experimentais em *P. cristatus* pode prover uma série de respostas às muitas questões referentes ao relacionamento hospedeiro - parasito - vetor, imunologia, patologia, susceptibilidade do hospedeiro a drogas etc..

Apesar disto, não existe um sistema experimental definido para estudos sobre os mecanismos de resistência imune do hospedeiro e os antígenos parasitários mais importantes na indução dessa resposta.

Sendo assim, os estudos mais recentes estão direcionados para a detecção, isolamento e identificação de antígenos parasitários circulantes, obtidos do sangue,

urina ou líquido hidrocelico de individuos infectados.

A demonstração inicial da presença de antígeno circulante no sangue de individuos infectados foi dada por Franks em 1946, usando sangue total como um antígeno em teste intradérmico para diagnóstico de filariose. Desde então muitos trabalhos foram realizados para a detecção e caracterização de antígenos parasitários e complexo imune circulante (CIC). Dissanayake e cols. (1983) por exemplo, isolaram CIC de pacientes infectados com **W. bancrofti**, por precipitação com polietilenoglicol e analisaram em gel de poliacrilamida, onde uma banda de PM = 25 kDa foi identificada por imunoprecipitação como um antígeno.

Para detectar a presença de antígeno circulante em soros de individuos infectados com **W. bancrofti**, Paranjape e cols. (1986) utilizaram soro anti-filárico de coelho marcado com <sup>131</sup>I identificando autoradiograficamente em papel de nitrocelulose uma proteína com PM = 200 kDa. Estudos adicionais quanto à estabilidade ao ácido e fervura, sensibilidade à pronase e periodato, indicaram tratar-se de uma glicoproteína.

O uso de antígenos excretados e/ou secretados, obtidos por cultivo **in vitro** de mfs., torna-se mais comum devido à maior especificidade e sensibilidade em imunodiagnóstico, se comparados aos antígenos somáticos obtidos de extrato de parasitos (Kaliraj e cols., 1979;

Karavondin e Ash, 1980; Dissanayake e cols., 1982; Kharat e cols., 1981, 1982 e Harinath e cols., 1984). No entanto, em relação à caracterização desses antígenos, os dados são escassos e as pesquisas ainda estão direcionadas à manutenção de mfs. **in vitro** (ver 1.4) e verificação da especificidade e sensibilidade em imunodiagnóstico (Kharat e cols., 1980, 1981, 1982 ; Ripoll, 1985 ; Reddy e cols., 1984a,b).

Em resumo, a caracterização antigênica de nematódeos, importante não só para a definição de proteínas espécie e estágio-específicas, como para a determinação das principais moléculas que evocam uma resposta imune, está ainda pouco desenvolvida. A maior razão para isto é a dificuldade de obter-se quantidades suficientes destas proteínas para seu estudo, aliada, no caso da **W. bancrofti**, à ausência de um modelo experimental acessível.

### **1.5 Cultivo in vitro de microfilárias de *Wuchereria bancrofti***

As primeiras tentativas de cultivo **in vitro** de microfilárias foram feitas no início deste século, conforme revisto por Coutelen (1929).

Naquela revisão o autor descreve experimentos em que mfs. de **W. bancrofti** foram cultivadas durante 32 dias em soro humano a temperatura ambiente. Foram observadas tanto modificações no tamanho das mfs. como em sua estrutura



interna.

Estes trabalhos entretanto não são muito conhecidos e artigos publicados mais recentemente (Kharat e cols., 1980; Ando e cols., 1980a) citam estudos realizados em torno de 1960 como pioneiros no cultivo **in vitro** de mfs. de **Dirofilaria immitis**, (Earl, 1959; Sawyer e Weinstein, 1963), **Litomosoides carinii** (Weinstein, 1963) e **Macacanema formosana** (Wood e Suitor, 1966), sendo definidos vários tipos de meios de cultivo mais apropriados para este fim.

Quanto às pesquisas com **W. bancrofti**, Chowdhury (1) e Bandyopadhyay (1960) e Bird e Menon (1961) (2) desenvolveram condições capazes de manter as mfs. vivas durante 3 ou 4 semanas, mas sem diferenciação.

Taylor (1960) cultivou as mfs. em meio Tyrode ou meio 199 com soro equino, o que provocou apenas o desembainhamento das microfilárias.

Weinstein (1963) empregou meio NCTC-109 complementado com soro humano, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace para insetos (1962), observando 4 a 7% das mfs. desenvolvendo-se até a forma "salsicha". O mesmo resultado foi obtido por Bhattacharya e Chowdhury (1964) (3) com solução de Locke contendo extrato de mosquito. As alterações morfológicas observadas nas

(1) CHOWDHURY, A.B. & BANDYOPADHYAY, A.K. **Bulletin Calcutta School of Tropical Medicine**, 8:105, 1960, "apud" KHARAT E COLS., 1980.

(2) BIRD, G.W.C. & MENON, K.K. **The Lancet**, 2:721, 1961, "apud" KHARAT E COLS., 1980.

(3) BHATTACHARYA, N.C. & CHOWDHURY, A.B. **Bulletin Calcutta School of Tropical Medicine**, 12:54, 1964, "apud" KHARAT E COLS., 1980.

mfs. geralmente envolvem um aumento em seu diâmetro, que corresponde perfeitamente ao espessamento dos embriões observados por Low (1912) no hospedeiro intermediário e por ele denominado "estádio de salsicha".

Sawyer e Weinstein (1963) classificaram os tipos de larvas de primeiro estágio do seguinte modo: tipo I (tipo mfs.), microfíliarias típicas ou com alteração uniforme de tamanho; tipo II (intermediária) larva distintamente mais larga, tipo III ("forma pré-salsicha"), significativamente mais larga e curta; tipo IV ("forma salsicha"), com espessura máxima e comprimento mínimo.

Estudos mais recentes apresentam um maior número de variáveis procurando definir quais as condições indutoras da diferenciação das mfs.. Ando e cols. (1980a) cultivaram mfs. de *D. immitis* em quatro meios (TC-199; MEM; M-41 e NCTC-109). Apesar de as mfs. terem sobrevivido durante um período mais longo em TC-199, não houve diferenciação neste meio. O meio NCTC-109 entretanto, induziu diferenciação apesar do pequeno número de mfs. que sobreviveram nele. O meio M-41, contendo uma linhagem de células de mosquito, propiciou diferenciação dos parasitas ao contrário dos meios TC-199 ou MEM em associação com células de mamíferos.

No meio NCTC-109, o número de larvas diferenciadas mudou em relação à quantidade adicional de soro e foi maior a 28°C que a 37°C.

Em um estudo posterior, Ando e Kitamura (1982) testaram o efeito da pressão osmótica do meio de cultivo na indução de diferenciação de mfs. de **D. immitis**. Estes autores chegaram à conclusão de que a pressão osmótica mais favorável é maior que a do plasma do cão, onde as mfs. vivem; portanto, a indução da diferenciação é dependente de um aumento na pressão osmótica no intestino do mosquito.

Kharat e cols., (1980) cultivaram microfilárias de **W. bancrofti** em meio 199 (A) ou meio 199 complementado com açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace (B) e observaram que, cerca de 30% das mfs. alcançaram a forma IV ("salsicha") no oitavo dia de cultivo em meio B, enquanto 10% em meio A no décimo sétimo dia. A maioria das mfs. nos vários estádios de desenvolvimento, era ativa e sobreviveu por três e duas semanas nos meios A e B respectivamente.

Ripoll (1985) testou os meios RPMI 1640 e Paker 199, com pH 7,2 - 7,4 ou 8,0 e temperaturas de 28° C ou 37° C, para cultivo de três espécies de filárias humanas (**W. bancrofti**, **Dipetalonema perstans** e **Loa loa**) e **D. immitis**. Apesar de terem sido estabelecidas quais as melhores condições para a sobrevivência das mfs. em nenhum dos casos foi observado indução de diferenciação.

Strote (1987) desenvolveu experimentos em que larvas infectantes (L3) de **Onchocerca volvulus**, filarídeo que infecta equinos, diferenciaram-se em larvas de quarto estádio, após 28 dias em cultura.

Outros estudos foram realizados com a finalidade de analisar as necessidades nutricionais de *D. immitis* (Ando e cols., 1980a), definindo-se assim um padrão dos aminoácidos mais consumidos pelos parasitas durante seu cultivo *in vitro*.

O cultivo de mfs. tem sido empregado para duas outras finalidades. Em primeiro lugar, este método é útil na análise das proteínas de superfície (PS) dos parasitas.

O estudo das PS é feito basicamente pela incubação das mfs. com soro policlonal ou anticorpos monoclonais (AcMn), cuja especificidade necessita determinar-se; podendo adicionar-se ainda uma fonte de complemento à cultura. Caso haja, no soro teste, anticorpos específicos para PS das mfs, observa-se uma diminuição na viabilidade das mesmas. Este efeito, proporcional à quantidade de anticorpos específicos e à sua capacidade de fixação do complemento, é detectado pela perda de motilidade das microfilárias.

Um modo alternativo de se efetuar o estudo das PS, envolve a incubação das microfilárias com o anti-soro ou AcMn a ser testado em placas de cultivo contendo células de exudato peritoneal (CEP).

As CEP são coletadas por lavagem do abdome de camundongos ou ratos com meio de cultura, obtendo-se assim uma população bastante heterogênea (macrófagos e linfócitos por exemplo).

Normalmente são utilizadas apenas as células aderentes a superfícies plásticas, população composta principalmente por macrófagos. Estes possuem na sua superfície receptores para a região **Fc** dos anticorpos, de modo que o resultado final do experimento é a aderência das CEP aos parasitas, caso o soro-teste ou AcMn contenham anticorpos específicos contra PS das microfilárias.

Os estudos acima, têm sido efetuados principalmente com mfs. dos gêneros **Brugia** e **Dirofilaria**. Aggarwal e cols. (1985) empregando AcMn, detectaram uma proteína de superfície em **B. malayi** responsável pela aderência de macrófagos peritoneais e morte das mfs.. Análise por imunoprecipitação mostrou que esta proteína tem PM = 110 kDa. Weil e cols. (1981) relataram a presença de anticorpos antifiláricos no soro de cães infectados com **D. immitis**. Estes anticorpos reconhecem uma proteína na superfície das mfs. induzindo a aderência de leucócitos caninos ao parasita.

A segunda área na qual o cultivo de mfs. tem se tornado também bastante útil é a caracterização de proteínas excretadas e/ou secretadas (antígenos E/S) pelos parasitas.

Nestes estudos de antígenos E/S as mfs. são cultivadas em condições padronizadas e após alguns dias o meio de cultivo é coletado e testado por métodos imunológicos para detecção e caracterização de proteínas filáricas nele contidas.

Alternativamente, os antígenos E/S são marcados com isótopos radioativos e analisados por eletroforese e autoradiografia.

Kaushal e cols. (1984) realizaram desta forma um estudo amplo de proteínas E/S da filária **B. malayi**, chegando à conclusão de que as proteínas de baixo peso molecular (10 - 70 kDa) são as que apresentam maior especificidade, enquanto as de maior peso molecular ocorrem mais frequentemente em outros parasitas.

Em **W. bancrofti**, Maizels e cols. (1986), analisaram proteínas de mfs. e larvas infectantes, demonstrando a presença em ambos os estádios de uma proteína de PM = 17 kDa e outra de PM = 21 kDa, sendo que apenas a primeira ocorre também na superfície do parasita. Antígenos de E/S têm sido também empregados com bastante sucesso no imunodiagnóstico da filariose bancroftiana (Kharat e cols., 1981; Kharat e Harinath, 1982).

No presente trabalho, o cultivo **in vitro** de mfs. de **W. bancrofti** foi um dos experimentos empregados que nos forneceu informações básicas para o conhecimento do processo de sobrevivência e diferenciação deste parasita.

O protocolo geral dos experimentos envolveu o isolamento das mfs. a partir do sangue de indivíduos infectados, sua suspensão em diferentes meios de cultivo contendo diversos componentes e incubação sob várias condições de temperatura.

A viabilidade e modificações morfológicas induzidas nos parasitas foram as principais observações feitas durante o cultivo dos mesmos.

## **1.6 Produção de Anticorpos Monoclonais**

### **1.6.1 Considerações Gerais**

Como já foi dito anteriormente, a implantação da tecnologia dos hibridomas, que secretam anticorpos monoclonais de especificidade predefinida, estabelecida por Köhler e Milstein (1975) possibilitou o desenvolvimento rápido de inúmeros campos da pesquisa biológica, na imunoparasitologia, no imunodiagnóstico clínico e na imunogenética.

Exemplos do emprego destes reagentes podem ser conhecidos pela análise com anticorpos específicos aos ácidos ribonucleico-ARN e desoxiribonucleico-ADN ou complexos ARN-proteína e ADN-proteína em pacientes com a doença autoimune lupus sistêmico eritematoso (Pisetsky, 1983).

Outros estudos com AcMn visam a determinação da localização cromossômica de um gene que codifica para uma função específica, por meio de análise de padrões isoenzimáticos produzidos por um painel de clones, a partir de fusões celulares humano-roedor (Campbell, 1984).

Finalmente podemos ainda citar os estudos em pacientes com anemia de Fanconi (sensibilidade ao efeito

clastogênico de agentes "crosslinking" em cultura de linfócitos do sangue periférico) para verificação da heterogeneidade genética nestes pacientes e para o estudo do efeito de dosagem gênica (Auerbach, 1987).

Os exemplos dados são apenas algumas das muitas pesquisas que estão sendo feitas e ilustram como em tão pouco tempo a produção de anticorpos monoespecíficos abriu novas perspectivas para os cientistas da pesquisa básica e aplicada.

Sendo a produção de AcMn, um dos objetivos do presente trabalho, alguns aspectos teóricos de sua produção devem ser considerados. A teoria dos AcMn baseia-se na hipótese da seleção clonal de Burnet (1957) que, em linhas gerais, enuncia: cada linfócito B de mamífero tem o potencial de fazer um anticorpo monoespecífico. A região constante de uma cadeia de imunoglobulina, pode alterar-se durante a diferenciação do clone de linfócito, mas a região variável retém sua especificidade.

A fusão celular dá-se entre duas linhagens de células geneticamente diferentes (mas ontogeneticamente semelhantes). Para melhor entender a formação de hibridomas e escolha de células usadas na fusão, resume-se que: o plasmócito (linfócito B diferenciado) morre em cultura, porém fornece a informação genética para o anticorpo eliciado; o mieloma cresce (multiplica-se) em cultura e pode portanto, conferir imortalidade à célula híbrida.



Após células do baço de um animal previamente imunizado serem fusionadas com células tumorais (mieloma) *in vitro*, o restante não fusionado (ou híbrido tumor-tumor) deve ser eliminado e feita uma seleção de células híbridas secretando anticorpo da requerida especificidade.

A linhagem de mieloma utilizada nestes experimentos é deficiente na enzima responsável pela incorporação no ADN da hipoxantina, a hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase- HGPRTase ou da timidina, a timidina quinase-TK. Deste modo sintetizam ribonucleotídeos apenas pela síntese de novo.

Acrescentando-se aminoptericina, que é um análogo do ácido fólico e se liga a ácido fólico redutase, ao meio de cultura contendo hipoxantina e timidina (meio HAT, Littlefield, 1964) bloqueiam-se as coenzimas requeridas para a síntese de novo e as células só podem sintetizar ADN pela via de salvação.

Assim, se células de mieloma HGPRTase deficientes são fusionadas com células linfóides normais e postas em meio seletivo HAT, apenas os híbridos mieloma-plasmócito crescerão; o mieloma fornecerá imortalidade e o plasmócito além da enzima HGPRTase, fornecerá a capacidade de síntese de anticorpos (Hudson e Hay, 1980; Campbell, 1984) (Figura 1.5).

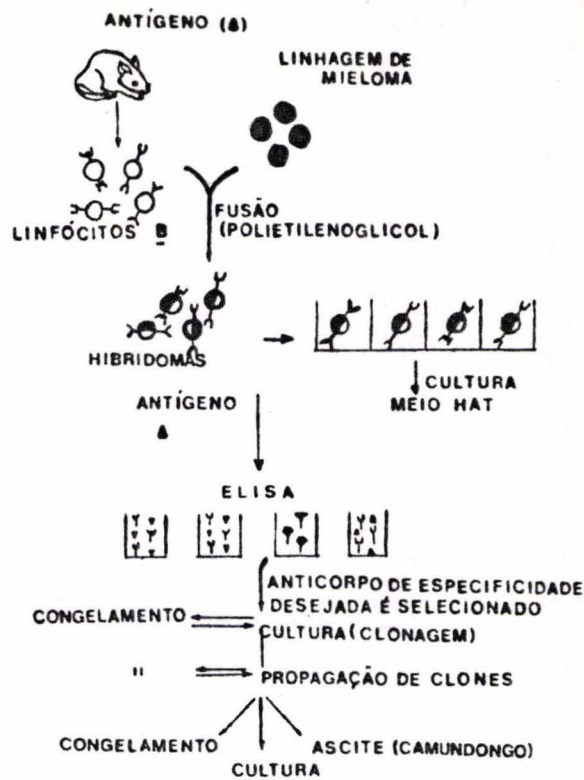


Figura 1.5 Esquema simplificado de produção de anticorpos monoclonais.

### 1.6.2 Utilização de Anticorpos Monoclonais em Filariose Animal e Humana

No que se refere à produção de AcMn contra parasitas de animais e do homem, particularmente helmintos, vários estudos têm sido feitos, em geral com estádios iniciais do desenvolvimento destes vermes, objetivando o isolamento e caracterização de antígenos que eliciam uma resposta imune no hospedeiro; principalmente para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento do imunodiagnóstico, pois ensaios com alta sensibilidade e especificidade conduzem a uma imunoterapia mais eficaz.

Os AcMn produzidos são em geral dirigidos contra

proteínas somáticas (internas e/ou de superfície) obtidas de homogenados de vermes jovens ou adultos ou de proteínas E/S *in vivo* ou *in vitro* (por cultivo dos parasitas).

Alguns estudos têm tentado a obtenção de anticorpos monoespecíficos contra proteínas de vermes filáricos. No entanto a dificuldade de obter-se material antigênico em quantidade suficiente para produção destes AcMn e realização de testes de confirmação de especificidade, ainda é um dos maiores empecilhos na obtenção dos mesmos.

Apesar das dificuldades mencionadas, resultados favoráveis têm sido obtidos. Des Moutis e cols. (1983) por exemplo, obtiveram um AcMn de classe IgM que reconheceu antígeno circulante no soro de pacientes infectados com ***Onchocerca volvulus***.

Um anticorpo de classe IgG obtido por Lucius e cols. (1988) mostrou ser específico para um antígeno imunodominante de adultos e larvas infectantes de ***O. volvulus***.

O "Laboratory Workshop" realizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1983) permitiu formar um quadro com um banco de AcMn já produzidos até então em filariose humana: Dois monoclonais específicos para microfilárias de ***Brugia malayi***; um monoclonal específico tanto para ***B. malayi*** quanto para ***B. pahangi*** e para ovos de ***O. volvulus***, um AcMn específico para adulto de espécies de ***Brugia***, mas

que também possui reatividade cruzada com antígenos de adultos de **Onchocerca** e **Dipetalonema vitae**; dois AcMn restritos para adultos de **Onchocerca** e um com semelhante especificidade contra a mesma, mas também com reatividade cruzada com **D. vitae**.

Outros estudos visando a identificação e caracterização de antígenos filáricos foram realizados com **B. pahangi**, onde três AcMn com diferentes especificidades antigênicas foram obtidos de camundongos imunizados com vermes adultos vivos (Sutanto e cols., 1985).

Em **Litomosoides carinii** os estudos ainda estão direcionados ao isolamento de antígenos e análise bioquímica de extratos protéicos do parasita em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio bem como infecção experimental em outros animais, com larvas e vermes adultos (Philipp e cols., 1984; Scott e MacDonald, 1958). No presente trabalho fornecemos dados com anticorpos monoclonais produzidos contra este parasita.

No que diz respeito à produção de AcMn contra microfilárias de **Wuchereria bancrofti**, Reddy e cols. (1984b) selecionaram 10 clones especificamente positivos para antígenos E/S por este parasita.

Forsyth e cols. (1985) obtiveram um AcMn designado Gib 13 e dirigido contra ovos de **O. gibsoni** que mostrou reação cruzada de antígenos no soro de uma população infectada com **W. bancrofti**, bem como antígeno circulante em

pacientes sintomáticos e assintomáticos, não havendo reação cruzada com infecções por outros helmintos.

Mais recentemente, Weil e cols. (1987) identificaram um antígeno de PM = 200 kDa no soro de humanos infectados com *W. bancrofti* e produziram um AcMn que se liga a este antígeno. O AcMn foi usado em ensaio imunoradiométrico, mostrando ser mais sensível e específico como teste diagnóstico à infecção ativa, não detectando antigenemia em soros de indivíduos de áreas não endêmicas a despeito de infecções com outros nematódeos.

Ainda sobre o antígeno acima, em pacientes microfilarêmicos infectados com *W. bancrofti*, Lal e cols. (1987) também obtiveram um AcMn específico para o antígeno em 93% de pacientes com microfilaremia, 46% daqueles com obstrução linfática e 56% de pacientes com eosinofilia pulmonar tropical (filariose oculta).

No presente trabalho, a obtenção de anticorpos monoclonais contra microfilárias de *W. bancrofti* teve sucesso após diversas imunizações de camundongos com diferentes preparações antigênicas.

## 1.7 Caracterização de *Litomosoides carinii*

### 1.7.1 Classificação Taxonômica

De acordo com a classificação mais simplificada de Chitwood e Chitwood, 1973 (Olsen, 1974), a espécie ***Litomosoides carinii*** pode ser assim situada:

PHILUM: Nematelminthes

CLASSE: Secernenta

ORDEM: Spiruridia

SUBORDEM: Spiririna

FAMILIA: Onchocercidae

GÊNERO: ***Litomosoides***

ESPECIE: ***Litomosoides carinii*** (Travassos, 1919)

### 1.7.2 Características Gerais

A descrição inicial de ***Litomosoides carinii*** foi dada por Travassos em 1919 sob o nome de ***Filaria carinii*** (Vaz, 1934), sendo o parasita obtido da cavidade pleural e peritoneal de um esquilo, ***Sciurus sp.***, de São Paulo, Brasil (Williams, 1948).

Os machos de ***L. carinii***, medem de 24 a 28 mm e as fêmeas variam de 50 a 100 mm. Esses vermes adultos são encontrados juntos formando novelos na cavidade peritoneal e pleural.

As microfilárias são encontradas na circulação sanguínea; não exibem periodicidade noturna ou diurna nem um

ciclo periódico de longa duração, mas há uma variação no número de microfilárias circulantes de hora a hora e de dia a dia (Bell e Brown, 1945).

Williams (1948) a partir de experimentos que indicassem qual o hospedeiro intermediário de **L. carinii**, encontrou que o carrapato **Liponyssus bacoti**, do rato do algodão, é o mais provável hospedeiro intermediário e vetor daquele parasita (embora não se possa excluir outros vetores), pois entre as espécies de artrópodos estudadas, foi a única onde formas em desenvolvimento do parasita foram encontradas.

Mudanças que ocorrem com as mfs. quando elas passam para a circulação periférica do rato do algodão, foram observadas por Kershaw (1949), e uma descrição completa dos estádios do ciclo de vida de **L. carinii**, pode ser obtida com os experimentos de Cross e Scott (1947), Williams (1948) e Scott e cols. (1951). Resumidamente, a microfilária desenvolve-se diretamente do embrião ao primeiro estágio sem uma muda e segue o padrão de ciclo de vida de outros nematódeos, ou seja, necessariamente três estádios larvais antes de ser transmitida ao hospedeiro definitivo. Nesse último, sofre uma terceira muda e passa ao quarto estágio, uma outra muda e é filária adulta.

### 1.7.3 Distribuição Geográfica

O parasita **L. carinii** é encontrado em ratos do

algodão do México, Texas e Flórida. No Brasil foram encontrados nos roedores **Holochilus vulpinus**, **Mus decumanus**, **Nectomys squamipes** e **Sigmodon hispidus** (Williams, 1948). Os exemplares de **L. carinii** do presente trabalho foram obtidos de ratos silvestres dos gêneros **Oryzomys** e **Akodon** de Torres/RS, Sul do Brasil e um **Oryzomys** da zona da mata de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

#### 1.7.4 Caracterização Antigênica

Muitos estudos sobre infecção experimental com **Litomosoides carinii** objetivando acompanhar os estágios do seu ciclo de vida ou imunogenicidade de formas larvais e/ou homogenados de vermes adultos, dominam o interesse da maioria dos trabalhos com esse filarídeo de ratos. Assim, pesquisas a respeito de moléculas antigênicas desse parasita iniciaram-se apenas recentemente.

Dasgupta e Bala (1978) realizaram experimentos para detectar a presença de antígenos circulantes em animais infectados experimentalmente por **L. carinii** e verificar o efeito desses antígenos em células T e B, pela demonstração *in vitro* de células formadoras de placa à antígeno T dependente.

Os pesquisadores acima, afirmaram que resposta humoral (linfócitos B) a eritrócitos de carneiro sugere que **L. carinii** pode exercer efeito imunossupressivo em ratos quando existe alta microfilaremia. Um efeito semelhante no



hospedeiro pelos parasitas pode ser resultado de sua ação em células B, células T ou macrófagos.

Dados sobre a caracterização antigênica de **L. carinii** são poucos; Philipp e cols. (1984), fizeram análise bioquímica de extratos de três estágios do ciclo de vida desses parasita usando técnicas de radio iodinação e detectaram um componente de PM = 55 kDa para vermes do terceiro estágio, fêmeas e machos adultos. Um segundo componente de PM = 67 KDa também foi observado em extratos de microfilárias.

No presente trabalho estamos apresentando alguns dados a partir da utilização de extratos de ovos, embriões e vermes adultos de **L. carinii**, contribuindo para um melhor conhecimento sobre caracterização antigênica desse parasita, que tem se mostrado um bom material de estudo em filariose, tanto animal quanto humana.

## 1.8 Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido com o nematódeo causador da filariose bancroftiana, *Wuchereria bancrofti* (Filaridae), responsável ainda por muitos fenômenos de natureza alérgica desencadeados no homem.

Foi também estudado o filarídeo parasita de ratos silvestres, *Litomosoides carinii* (Onchocercidae).

Como objetivo geral, procurou-se estabelecer um sistema que analisasse, através de métodos imunológicos, as principais proteínas somáticas (internas e/ou de superfície) e de excreção e/ou secreção apresentadas por estes parasitas em diferentes fases de diferenciação, visando-se ainda contribuir para o estudo do relacionamento genético entre os filarídeos estudados.

Os objetivos específicos foram:

- (a) Verificar através do cultivo *in vitro* de microfilárias (mfs.) de *W. bancrofti*, as condições indutoras responsáveis pela sobrevivência e diferenciação das mfs. e os principais eventos ocorridos durante este processo;
- (b) Empregar os produtos obtidos durante o cultivo *in vitro* de mfs. para a análise de proteínas internas e de superfície e de excreção e/ou secreção destes parasitas.

- (c) Utilizar soros de pacientes infectados com **W. bancrofti** ou de indivíduos residentes em áreas endêmicas para a análise do efeito destes soros humanos imunes em mfs. co-cultivadas com células de exudato peritoneal murino;
- (d) Verificar a existência de reatividade cruzada entre antígenos de **W. bancrofti** e de **L. carinii**;
- (e) Produzir anticorpos monoclonais anti mfs. de **W. bancrofti** e anti ovos e embriões de **L. carinii**;
- (f) Caracterizar proteínas dos parasitas por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- (g) Analisar a partir de todos os dados obtidos, quais os pontos mais críticos na caracterização antigênica de **W. bancrofti**.

## 2 MATERIAL E METODOS

### 2.1 Microfilárias de *Wuchereria bancrofti*

#### 2.1.1 Coleta

Para obtenção de microfilárias a partir de amostras de sangue de indivíduos infectados, contamos com a colaboração da equipe do Programa de Filariose (PFI) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Recife (PE), coordenada pela Dr<sup>a</sup> Gerusa Dreyer.

A equipe vem realizando inquéritos hemoscópicos em áreas foco do mosquito vetor. Os indivíduos destas áreas são submetidos a um protocolo geral de exame ou a um protocolo especial de acordo com o estado clínico dos mesmos. Foi a partir de alguns destes indivíduos que recebemos amostras de sangue infectado com microfilárias ou soro imune de pacientes com as mais diversas formas clínicas da doença.

Cada amostra tratava-se, em geral, de 10 ml em

pool, do sangue de 2 a 3 indivíduos microfilarêmicos, coletados após o consentimento dos mesmos, de modo que pudéssemos ter um número maior de mfs. após filtração do mesmo. O sangue foi coletado entre 23:00 e 1:00 h, posto em solução de citrato de sódio 3,8% em proporção de 1:9 e deste modo enviado para o nosso laboratório por acondicionamento em isopor com gelo e transporte por via aérea. Em geral, da coleta ao processamento final do sangue não foram ultrapassadas 40 horas.

Entre os empecilhos que a equipe do PFi encontra para trabalhar com a filariose bancroftiana estão aqueles relacionados aos pacientes, ou seja, a conscientização da necessidade de exames periódicos, pois os microfilarêmicos são frequentemente assintomáticos.

### **2.1.2 Isolamento**

Para isolamento das microfilárias, amostras de sangue de indivíduos infectados, diluídas em citrato de sódio a 3,8% em proporção de 1:9 foram filtradas em membrana de policarbonato de 25 mm com poros de 3  $\mu$ m em suporte Holder (Nuclepore Corporations).

Antes de iniciar a filtração do sangue, este foi deixado a sedimentar retirando-se o excesso de citrato de sódio por aspiração do sobrenadante formado. Em seguida o sangue foi filtrado sendo que, para cada 2 ml acrescentou-se 8 ml de NaCl a 0,85% (segundo L.D. de Andrade, comunicação pessoal).

O filtro com mfs. foi posto em placa de Petri

contendo meio de cultura mínimo essencial (MEM, Flow) ou solução de tampão PBS com 0,15 M de NaCl e 0,01 M de fosfato de sódio pH 7,4 (este tampão foi usado nos passos seguintes de modo que será referido como tampão PBS apenas).

A recuperação das mfs. foi realizada com lavagens sucessivas do filtro após cada 10 ml de sangue filtrado. A solução contendo as mfs. foi centrifugada a 800x g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as mfs. foi ressuspendido em quantidade mínima de meio MEM ou PBS.

Amostras de 10 ul foram retiradas e postas em lâmina para contagem dos vermes em microscópio (Zeiss). A suspensão de mfs. foi alíquotada e estocada a 4°C ou a -20°C até o uso.

É importante salientar que, quando o isolamento das mfs. destinava-se ao seu cultivo *in vitro*, todo o procedimento anteriormente descrito foi realizado em câmara de fluxo laminar sob condições estéreis, bem como todo o material e soluções usadas.

Ainda com relação as mfs. cultivadas, estas foram recuperadas por centrifugação após o término dos experimentos, sendo então estocadas para utilização posterior como antígeno.

### **2.1.3 Preparo do Extrato Protéico Solúvel**

Para preparo de um extrato protéico solúvel do

parasita, cerca de 100.000 mfs., diluídas em tampão PBS, sofreram processo de ultra som (Thornton) com 10 a 15 pulsos de 50 mA por 30 s com intervalos de 1 minuto.

Na solução contendo as microfilárias foram previamente postos dois inibidores de proteases Fenilmetilsulfonilfluoreto-PMSF e Pepstatina (Sigma) na concentração de 1 mM e 5uM respectivamente e 1% de Desoxicolato (Sigma) para a extração de proteínas do parasita.

A verificação do rompimento das mfs. foi realizada durante os intervalos com alíquotas postas em lâmina e observadas ao microscópio. Todo o procedimento com o ultra som foi realizado em tubos apoiados sobre camada de gelo picado para manter a temperatura da amostra entre 4° e 8° C. Após total rompimento das mfs., parte do extrato total obtido e denominado WBT, foi centrifugado a 13.000x g (centrifuga Sorval modelo RC 5B rotor SS34) ou 5.000x g por 30 min a 4° C enquanto uma alíquota de 500 ul foi estocada a - 20° C até o uso.

O sobrenadante, denominado WBS, foi coletado e a leitura da concentração protéica foi realizada pelo método de Lowry e cols. (1951). Este sobrenadante, bem como o precipitado denominado WBPPT (ressuspendido em quantidade mínima de tampão PBS), foram separadamente aliquotados e estocados a - 20° C até o uso.

## 2.1.4 Cultivo *in vitro* de Microfilárias

### 2.1.4.1 Condições Gerais de Cultivo

O sangue de indivíduos filarêmicos foi coletado e estocado em condições estéreis até o isolamento das microfilárias. Foi processado conforme descrito anteriormente, mantendo-se durante todo o procedimento condições assépticas.

Após serem isoladas, as mfs. foram lavadas e ressuspendidas, em números variando de 500 a 4.000 mfs./ml, no meio de cultura definitivo. Os meios empregados foram:

(a) RPMI 1640 (Flow), complementado com:

Bicarbonato de Sódio (Inlab) = 2 g/l  
Ácido Pirúvico (Sal sódico) (Inlab) = 0,11 g/l  
Glicose a 30% (Inlab) = 20 ml/l  
Garamicina = 40 mg/l  
Fungizone (Squibb) = 2,5 mg/l  
HEPES (Inlab) = 2,38 g/l (em alguns casos)

(b) Meio 199 (Flow), complementado com as mesmas substâncias e quantidades usadas para o RPMI 1640;

(c) MEM (Flow), complementado apenas com os antibióticos e HEPES.

Os meios de cultura acima descritos foram usados com pH 7,3 - 7,4 e foram ainda complementados, em alguns casos, com soro fetal bovino (SFB, Cultilab) ou soro humano, coletado de indivíduos normais de áreas não endêmicas para filariose (SHN) ou de indivíduos afetados pela doença (SHI).

A quantidade de soro adicionada variou conforme



cada experimento. Em alguns experimentos foram ainda adicionados às culturas açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace para insetos (Grace, 1962):

Açúcares: Glicose = 0,7 mg/ml; Frutose = 0,4 mg/ml  
Sacarose = 0,3 mg/ml

Ácidos Orgânicos: Ácido Málico = 0,67 mg/ml  
Ácido Cetoglutárico = 0,37 mg/ml

Num outro experimento foi utilizado um extrato de 200 drosófilas adultas (mosca de frutas), preparado por homogeneização das mesmas em 5 ml de tampão PBS e centrifugação a 800x g por 5 min. O sobrenadante foi esterilizado por filtração (Membranas Sartorius) e estocado a - 20° C até o uso.

As microfilárias foram cultivadas em frascos de vidro (VidroLex) de 75 ml ou em placas plásticas (Costar) de 96 ou 24 cavidades.

As condições de cultivo foram variáveis, principalmente em relação à temperatura e à concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, sendo descritas juntamente com cada experimento.

As culturas foram examinadas diariamente sob microscópio invertido (Zeiss), para avaliação dos diversos parâmetros em estudo.

Nos cultivos onde foi observada a viabilidade das mfs., dois critérios foram estabelecidos: a sobrevivência das microfilárias (período em que, na cultura, observavam-se mfs. vivas) e a sua meia vida (intervalo de tempo até que

50% dos parasitas morressem).

Quanto à motilidade, foram atribuídos valores relativos, variando de 5 a 0. Em alguns casos, houve troca diária do meio de cultura, enquanto em outros foi mantido o mesmo meio ao longo de todo o experimento.

Para registro fotográfico das microfilárias em cultivo, estas foram removidas das placas sob condições estéreis. Diversas formas do parasita em diferenciação foram fotografadas com filme Panatomic X (Kodak).

#### **a) Preparação de Placas Para Cultivo com Células de Exudato Peritoneal Murino**

Para os experimentos em que as microfilárias foram cultivadas sobre uma camada de células de exudato peritoneal-CEP, o seguinte procedimento foi adotado: sob condições estéreis, células foram coletadas de camundongos C57B1/10 (ver 2.3) por lavagem da cavidade abdominal com 10 ml de meio MEM. Após serem lavadas 3 vezes por centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10 % de SFB em concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/ml. A suspensão foi colocada em placas de 96 ou 24 cavidades (0,1 ml ou 0,5 ml respectivamente), e incubada durante 2 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. As células não aderentes foram então removidas através da retirada do meio e duas lavagens posteriores com meio de cultura por pipetagem, as células aderentes foram utilizadas

para o cultivo de microfilárias.

Nos experimentos em que foi testado o efeito de soro imune sobre as microfilárias, estes foram incubados a 56°C durante 20 min (inativa apenas o complemento).

Após apropriadamente diluídos em meio RPMI 1640, os soros foram adicionados às células aderentes na placa e estas foram incubadas durante 5 h, a 37°C e com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Nos casos em que o complemento foi utilizado, acrescentou-se às cavidades da placa, 5% de soro fresco de camundongo não imune. As microfilárias foram então postas às culturas em número de 100 ou 200/cavidade, para placas de 96 ou 24 cavidades respectivamente.

Após o término dos experimentos, as microfilárias foram removidas por centrifugação e o meio de cultivo estocado a 4°C em condições estéreis, para detecção em ELISA de proteínas excretadas e/ou secretadas.

#### **2.1.4.2 Experimento # 1: Cultivo de Microfilárias a 37°C Com 5% de CO<sub>2</sub> no Ar.**

Neste experimento, as microfilárias foram cultivadas numa concentração de 500/ml, em placas de 24 cavidades (0,5 ml/cavidade), sendo utilizados 3 meios de cultivo conforme indicado na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROFILARIAS DE *M. bancrofti* A 37°C COM 5% DE CO<sub>2</sub> NO AR. (Representado apenas uma cavidade de cada condição de cultivo)

Cultura	Meio de Cultura	Complementação*
1	199 completo + HEPES	-
2	"	20 % SFB
3	"	20 % SHN
4	"	20 % SHN + aao
5	RPMI 1640 completo + HEPES	-
6	"	20 % SFB
7	"	20 % SHN
8	"	20 % SHN + aao
9	MEM completo + HEPES	-
10	"	20 % SFB
11	"	20 % SHN
12	"	20 % SHN + aao

\* SFB - Soro Fetal Bovino; SHN - Soro Humano Normal; aao - açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace para insetos

Os testes, neste e nos demais experimentos foram duplicados sendo preparadas duas cavidades para cada condição de cultivo.

As placas contendo as mfs. foram incubadas em uma estufa a 37°C. Para manter uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram postas em caixas fechadas nas quais o ar foi substituído completamente por uma mistura gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> (Oxigênio do Brasil). O experimento foi acompanhado durante 10 dias, sendo o meio de cultura trocado diariamente.

TABELA 2.1 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROFILARIAS DE *W. bancrofti* A 37°C COM 5% DE CO<sub>2</sub> NO AR. (Representado apenas uma cavidade de cada condição de cultivo)

Cultura	Meio de Cultura	Complementação*
1	199 completo + HEPES	-
2	"	20 % SFB
3	"	20 % SHN
4	"	20 % SHN + aao
5	RPMI 1640 completo + HEPES	-
6	"	20 % SFB
7	"	20 % SHN
8	"	20 % SHN + aao
9	MEM completo + HEPES	-
10	"	20 % SFB
11	"	20 % SHN
12	"	20 % SHN + aao

\* SFB - Soro Fetal Bovino; SHN - Soro Humano Normal; aao - açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace para insetos

Os testes, neste e nos demais experimentos foram duplicados sendo preparadas duas cavidades para cada condição de cultivo.

As placas contendo as mfs. foram incubadas em uma estufa a 37°C. Para manter uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram postas em caixas fechadas nas quais o ar foi substituído completamente por uma mistura gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> (Oxigênio do Brasil). O experimento foi acompanhado durante 10 dias, sendo o meio de cultura trocado diariamente.

As placas foram observadas a cada 24 horas sob microscópio invertido para a análise da porcentagem de mfs. viáveis. Como os embriões são muito móveis, a perda de viabilidade caracteriza-se por uma diminuição na motilidade.

#### 2.1.4.3 Experimento # 2: Cultivo de Microfilárias a 28°C Sem CO<sub>2</sub> no Ar ou a 37°C Com 5% de CO<sub>2</sub> no Ar.

Neste segundo experimento, as microfilárias foram cultivadas na mesma concentração do primeiro e em placas de 24 cavidades (Tabela 2.2).

TABELA 2.2 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROFILÁRIAS DE *W. bancrofti* A 28°C, SEM CO<sub>2</sub>, OU A 37°C, COM 5% DE CO<sub>2</sub> NO AR. (Representado apenas uma cavidade de cada condição de cultivo)

Cultura	Meio de Cultura	Complementação*
1	RPMI 1640 completo + HEPES	-
2	"	ao
3	"	20 % SFB
4	"	20 % SFB + ao
5	"	20 % SHN
6	"	20 % SHN + ao
7	199 completo + HEPES	-
8	"	ao
9	"	20 % SFB
10	"	20 % SFB + ao
11	"	20 % SHN
12	"	20 % SHN + ao

\* SFB - Soro Fetal Bovino; SHN - Soro Humano Normal; ao - açúcares e ácidos orgânicos do meio de Grace para insetos.

Nos cultivos mantidos a 37°C foi utilizada uma estufa automática (Napco, Modelo 5300), com 5% CO<sub>2</sub> no ar. O experimento foi seguido durante 16 dias, com troca de meio de cultura a cada 4 dias.

**2.1.4.4 Experimento # 3: Cultivo de Microfilárias a 28°C ou a 37°C Sem CO<sub>2</sub> no Ar ou a 37°C Com 5% de CO<sub>2</sub> no Ar em Placas Com ou Sem Células de Exudato Peritoneal-CEP.**

Neste experimento, as microfilárias foram cultivadas em concentração de 500/ml, em placas de 24 ou 96 cavidades (0,5 e 0,1 ml/cavidade) (Tabela 2.3).

TABELA 2.3 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MFS. DE *W.bancrofti*, EM MEIO RPMI 1640 SEM HEPES

Temperatura	CO <sub>2</sub>	Complementação*	CEP**
37°C	5 %	-	-
		-	+
		15 % SFB	-
		15 % SFB	+
		15 % SHN	-
37°C	-	15 % SHN	+
		-	-
		-	+
		15 % SFB	-
		15 % SFB	+
28°C	-	15 % SHN	-
		15 % SHN	+
		-	-
		15 % SFB	-
		15 % SFB	+
28°C	-	15 % SHN	-
		15 % SHN	+
		-	-
		15 % SFB	-
		15 % SFB	+

\* SFB - Soro Fetal Bovino; SHN - Soro Humano Normal;

\*\* CEP, células de exudato peritoneal. -, ausência; +, presença.

Foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 completo sem HEPES, em presença ou ausência de uma camada de células aderentes de exudato peritoneal-CEP, conforme indicado na Tabela acima.

O meio de cultura não foi trocado, sendo adicionado 50% a mais de meio no sexto dia. O experimento foi realizado duas vezes, com remessas diferentes de sangue estéril com microfilárias.

#### **2.1.4.5 Experimento # 4: Cultivo de Microfilárias em Frascos**

Para cada experimento descrito onde empregou-se placas de 24 cavidades, foi utilizado um frasco de cultivo sob as mesmas condições, sendo o número de mfs. aproximadamente igual a 28.000/frasco. Foi considerado como um outro experimento apenas para uma melhor compreensão do texto.

#### **2.1.4.6 Experimento # 5: Diferenciação de Microfilárias**

Para verificação de diferenciação de microfilárias, foram utilizados os mesmos experimentos descritos anteriormente. Foram observadas diariamente, até o final do experimento, a motilidade e modificações morfológicas nas microfilárias.



#### 2.1.4.7 Experimento N° 6: Cultivo de Microfilárias com CEP em Presença de Soro Imune

Este experimento foi realizado para testar o efeito de soro imune coletado de camundongos imunizados com o parasita ou de indivíduos naturalmente infectados, sobre as microfilárias de *W. bancrofti*.

As mfs. foram cultivadas em placas de 96 cavidades sobre uma camada de CEP murino, com adição de soro a ser testado (inativado) e de soro fresco de camundongo como fonte de complemento em uma duplicação do teste.

As placas foram incubadas em estufa automática a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> no ar. Cada condição de cultivo foi também duplicada, constando portanto de duas cavidades da placa. O meio de cultivo não foi trocado durante o experimento.

As Tabelas 2.4 e 2.5 descrevem as características dos soros utilizados neste experimento. Com relação aos soros humanos, estes foram coletados em Recife e Olinda (PE) pela equipe do PFi do CPqAM-FIOCRUZ.

TABELA 2.4 - CARACTERISTICAS DOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c TESTADOS NO CULTIVO IN VITRO DE MICROFILÁRIAS (MFS.) DE *W. bancrofti*.

Soro nº	Antígeno*	Dose	Via de imunização	Nº de injeções	ELISA**
8b	WBS	0,1 ml (50 ug)	intraperitoneal	3	+++
22	WBS	"	"	3	+++
3b	WBI	1.000 mfs.	"	2	++++
16	WBI	2.000 mfs.	"	3	+++

\* WBS, sobrenadante de extrato protéico de mfs. de *W. bancrofti*; WBI, mfs. integras de *W. bancrofti*. \*\* +++/++++, três ou quatros vezes mais forte a reação em relação ao soro imune de camundongo.

TABELA 2.5 - CARACTERÍSTICAS DOS SOROS HUMANOS UTILIZADOS NO CULTIVO **IN VITRO** DE MICROFILÁRIAS (MFS.) DE **W. bancrofti**.

Soro nº	Filaremia (mfs./ml de sangue)	Paciente/Eosinofilia (nº eos./mm <sup>3</sup> )	Clinica*
3	43	750	Assintomático(As.)
4	198	225	"
5	5	225	"
6	100	1.250	"
7	34	325	"
8	331	950	"
9	12	725	"
10	Incontáveis	900	Assintomático
11	1.004	900	"
12	123	400	"
13	6	1.075	"
14	4800	1.350	"
15	206	1.000	"
31	418	1.775	Quilúria
42	4950	2.325	Parasitose
60	Negativo	-	As./ Área endemica (ae)
61	3	1.350	Pós-DEC
62	Negativo	24.850	EPT(1)
63	"	6.550	EPT
64	"	-	As./ ae
65	"	7.750	EPT
66	"	275	Elefantíase
67	"	13.350	EPT
68	"	22.775	EPT
69	"	14.425	EPT
70	"	1.850	Asma
71	"	31.600	EPT
72	"	-	HCP
73	"	15.700	EPT
74	"	2.400	HE
75	"	-	HE
76	"	700	Quilúria
77	"	6.100	EPT
78	165	1.225	Quilúria
79	Negativo	-	HE-ae
80	"	250	As./ ae
106	"	-	IS
107	"	-	As./ ae
110	"	-	HE-ae
115	"	-	HE-nf pós DEC
116	"	-	HE em DEC
118	"	-	HE pós DEC
119	"	-	"
121	"	-	HEA pós DEC
122	"	-	HE pós DEC
123	"	-	HE pós Pantelmin

continua...

continuação

TABELA 2.5 - CARACTERÍSTICAS DOS SOROS HUMANOS UTILIZADOS NO CULTIVO **IN VITRO** DE MICROFILÁRIAS (MFS.) DE **W. bancrofti**.

Soro nº	Filaremia (mfs./ml de sangue)	Paciente/Eosinofilia (nº eos./mm <sup>3</sup> )	Clínica*
124	Negativo	-	HE nf pós DEC
127	"	-	HE
128	"	-	HE pós-DEC
132	"	-	"
138	"	-	"

\* DEC, dietilcarbamazina; EPT, eosinofilia pulmonar tropical ( - (1) recidivante); HCP, helminto em ciclo pulmonar; IS, Strongyloides + helmintos; HE, hipereosinofilia ( - nf. não filarial; - A e adenopatia).

O experimento foi acompanhado durante 7 dias, sendo analisadas 4 características nas culturas: viabilidade e motilidade das microfilárias, porcentagem de mfs. com CEP aderidas (% de aderência) e número médio de células aderidas a cada microfilária. A análise estatística (correlação - r / t-teste) foi realizada com alguns dos dados obtidos neste experimento.

#### 2.1.4.8 Experimento # 7: Detecção de Proteínas Excretadas e/ou Secretadas - E/S por Microfilárias Durante Cultivo *in vitro*

Para detectar proteínas E/S por microfilárias, os meios de cultivo foram processados da seguinte forma:

- Concentração em sacos de diálise (2 vezes o volume inicial) contra glicose (Inlab) e utilização em teste ELISA:

- Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 ul/cavidade, de antígeno E/S e incubadas por 12 a 24 h.

Seguiu-se então o protocolo básico de ELISA.

Como controle negativo utilizou-se sobrenadante de SP20-Ag-14 e como controle positivo, anti soros anti **W. bancrofti**. Foram testados então alguns monoclonais anti **W. bancrofti**. A leitura do ELISA foi realizada visualmente e por densitômetro após inibição da reação.

## **2.2 Litomosoides carinii**

### **2.2.1 Coleta**

Os vermes adultos de **Litomosoides carinii** foram obtidos de ratos dos gêneros **Oryzomys** e **Akodon** coletados em Torres-RS, e em um exemplar de **Oryzomys** da Zona da Mata de Pernambuco.

### **2.2.2 Isolamento do Verme Adulto, Ovos e embriões**

Vermes adultos de **Litomosoides carinii** foram coletados da cavidade peritoneal e mais raramente da cavidade pleural de ratos infectados, através de punção dos vermes isolados ou agrupados formando "novelos".

As fêmeas, cerca de duas vezes maiores que os machos, foram separadas para isolamento de ovos e embriões.

Cada fêmea viável foi posta em placa de Petri com solução de tampão PBS e em seguida posta em outra placa contendo água bidestilada. Após alguns segundos houve rompimento do útero da filária e liberação de ovos e embriões, que foram puncionados com micropipeta de 20  $\mu$ l

segundo o método desenvolvido por L.D. de Andrade (CPqAM-FIOCRUZ, Recife (PE), comunicação pessoal).

Algumas amostras de ovos e embriões de *Litomosoides carinii* foram selecionadas para imunização de camundongos da linhagem endocruzada BALB/c (ver 2.3.1) e outras para a preparação de extrato solúvel protéico.

### 2.2.3 Preparo do Extrato Protéico Solúvel

Cinquenta vermes adultos reunidos em tubo contendo 10 ml de tampão PBS e PMSF 1 mM foram homogeneizados e em seguida submetidos a ultra som com 6 pulsos de 50 mA com intervalos de 1 minuto, a 4°C.

Parte do extrato obtido (LCTA) foi centrifugado a 800x g por 30 min a 4°C enquanto uma amostra de 500  $\mu$ l foi estocada a -20°C até o uso.

O sobrenadante obtido após centrifugação e denominado LCSA, foi concentrado 2x em saco de diálise contra Ficoll cristalizado (Sigma). A leitura da concentração protéica foi realizada pelo método de Lowry e cols. (1951).

O precipitado denominado LCPPTA, foi diluído em quantidade mínima de tampão PBS. Ambas as amostras foram divididas (alíquotas) e estocadas a -20°C até o uso.

Ovos e embriões de *L. carinii*, em concentração de cerca de  $1 \times 10^8$  / ml e  $6 \times 10^6$  / ml respectivamente, receberam o mesmo tratamento utilizado para os vermes

adultos destes parasitas, para obtenção de um extrato protéico solúvel.

Nesta amostra foram dados 3 pulsos de 30 s cada no ultra som com intervalos de 1 min . Após todo o procedimento, o sobrenadante (LCSOE) bem como o precipitado (LCPOE) foram aliquotados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### 2.3 Imunizações de Camundongos

Camundongos da linhagem endocruzada BALB/c foram mantidos no biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para imunizações com diversas preparações de antígenos dos parasitas estudados no presente trabalho.

Os camundongos adultos (2-4 meses) foram tratados em gaiolas separadas por grupo de imunização; a alimentação foi realizada com ração para camundongos (Germani), sendo a limpeza das gaiolas e a troca de água , feitas sempre que necessárias. A temperatura manteve-se em torno de  $25^{\circ}\text{C}$ .

No sétimo dia seguinte à imunização de cada camundongo, foi realizada a coleta de sangue por corte superficial na artéria caudal para obtenção de soro.

Uma outra linhagem de camundongos, a C57BL/10, foi utilizada para a obtenção de CEP, em alguns experimentos de cultivo **in vitro** de mfs. Estes camundongos foram também mantidos no mesmo biotério acima, sendo cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Maria Clara G. da Luz, do Departamento de Genética da UFRGS.

### 2.3.1 Com Antígenos de *Wuchereria bancrofti* e de *Litomosoides carinii*

Foi utilizado mais de um protocolo para imunizações de camundongos da linhagem endocruzada BALB/c, assim de acordo com cada preparação antigênica dos parasitas (*W. bancrofti* ou *L. carinii*) foram imunizados diferentes grupos de camundongos conforme tabela 2.6 e 2.7.

TABELA 2.6 - IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PREPARAÇÕES ANTIGENICAS DE *W. bancrofti*

Linhagem de camundongo	Antígeno*	Dose/camundongo	Nº de doses	Via**	Nº de camundongos
BALB/c	WBI	5.000 mfs.	2	IP	2
"	WBI	1.000 "	2	"	2
"	WBI	300 "	2	"	2
"	WBI	200 "	3	"	4
"	WBT	0,1 ml (50 ug)	3	"	2
"	WBS	0,1 ml ( " )	5***	"	2
"	WBPPT	0,1 ml (50 ug)	3	"	4

\* WBI - microfilárias (mfs.) integras de *W. bancrofti*; WBT - extrato protéico total de mfs. de *W. bancrofti*; WBS - sobrenadante de extrato de protéico de mfs de *W. bancrofti*; WBPPT - precipitado de extrato protéico de mfs de *W. bancrofti*.

\*\* IP, intraperitoneal;

\*\*\* Com Adjuvante Completo de Freund nas duas primeiras doses.

TABELA 2.7 IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PREPARAÇÕES ANTIGENICAS DE *L. carinii*

Linagem de camundongo	Antígeno*	Dose/camundongo	Nº de doses	Grupos/Via**	Nº camundongos
BALB/c	LCOE	3 10 ovos/0,03x10 embriões	5 3	1/IP	4
"	LCOE	3 10 ovos/0,03x10	5 "	2/EV	4
"	LCOE	4 10 ovos/0,3x10	5 "	3/IP	4
"	LCOE	4 10 ovos/0,3x10	5 "	4/EV	4
"	LCOE	5 10 ovos/3x10	5 "	5/IP	4
"	LCOE	5 10 ovos/3x10	5 "	6/EV	4
"	LCTA	0,1 ml ( 50 ug )	5***	7/IP	2
"	LCPPTA	0,1 ml ( 50 ug )	3	8/IP	2

\* LCOE, ovos e embriões de *L. carinii*; LCTA, extrato protéico de vermes adultos de *L. carinii*; LCPPTA, precipitado de extrato protéico de vermes adultos de *L. carinii*.

\*\* IP, Intraperitoneal; EV, Endovenosa

\*\*\* Com adjuvante completo de Freund nas duas primeiras doses.

## 2.4 Teste Imunoenzimático - ELISA

O teste imunoenzimático-ELISA, foi utilizado para confirmação da presença de anticorpos em soros de camundongos imunizados com preparações antigênicas diversas de *Wuchereria bancrofti* e *Litomosoides carinii* conforme descrito anteriormente, ou com sobrenadantes de cultura de hibridomas.

A técnica utilizada foi a descrita por Engwal e Perlman (1971) com algumas modificações:

- (a) Placas plásticas especiais de polivinil (Inlab), com 96 cavidades foram sensibilizadas de acordo com cada protocolo



de experimento, com 10 ug/ml da preparação antigênica diluída em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 8,6 e incubadas por 12 h a 4°C. Nesta etapa e nas demais, foi posto um volume de 100 ul/cavidade;

- (b) Após inversão da placa para retirada do excesso de antígeno que não se fixou, a mesma foi incubada com um substituto da albumina do soro bovino, o bloto 5% (leite em pó desnatado Molico (Nestlé) em tampão PBS). Foram feitas 3 incubações de 5 min em temperatura ambiente (TA);
- (c) Incubação da placa com bloto 5% a 37°C por 30 min;
- (d) Três lavagens de 5 min com bloto 1% a TA;
- (e) Incubação a 37°C por 60 min com anti-soros diluídos apropriadamente em bloto 1% ou incubação com sobrenadantes de cultura de hibridomas (conforme cada protocolo). Os controles positivos consistiram de anti-soros de camundongos imunizados e controles negativos, soro normal de camundongos ou sobrenadante de cultivo de mieloma SP20-Ag-14 (linhagem não secretora de imunogloblina);
- (f) Repetição de "d";
- (g) Incubação com 100 ul/cavidade do anticorpo

secundário (anti-IgG de camundongo), conjugado à enzima peroxidase (Sigma), na diluição 1/1.000 em bloto 1% a TA;

- (h) Três lavagens de 5 min com tampão PBS a TA;
- (i) Adição do substrato: 3,4 mg de Orto-Fenileno-Diamina-OPD (Sigma) em 10 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 e 15 ul de peróxido de hidrogênio 30 %;
- (j) Inibição da reação com 50 ul/cavidade de H<sub>2</sub>S0<sub>4</sub> 12,5%.

A reação positiva foi observada visualmente pela coloração amarelo-alaranjada. Em alguns experimentos, a leitura foi realizada em densitômetro e em outros visualmente, sendo então estabelecidos valores arbitrários de 0-4 em relação aos controles negativos e positivos respectivamente.

## 2.5 Imunofluorescência Indireta - IFAT

Para detectar antígenos de superfície em microfilárias de **W. bancrofti**, foi realizado o teste de Imunofluorescência com anticorpos-IFAT da seguinte forma:

- (a) Em tubos Eppendorf, foram postos 50 mfs. diluídas em 50 ul de tampão PBS e centrifugadas a 8.000x g por 30 s;
- (b) Após remoção do sobrenadante, acrescentou-se 50 ul do anti-soro teste ou anticorpo

monoclonal anti **W. bancrofti** nas diluições apropriadas;

- (c) Incubação por 30 min a TA;
- (d) Lavagem (3 vezes) por centrifugação com 50 ul de tampão PBS por 30 s;
- (e) Remoção do sobrenadante e incubação por 30 min a TA com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou humana) conjugado a Fluoroceína-FITC (Microbiológica), diluído em tampão PBS 1/20 ou 1/40;
- (f) Repetição de "d";
- (g) Ressuspensão em quantidade mínima de tampão PBS e visualização em microscópio de fluorescência (Zeiss) após terem sido postas alíquotas em lâminas;

## **2.6 Produção de Anticorpos Monoclonais**

### **2.6.1. Obtenção de Linfócitos Imunes e Fusão Celular**

Os protocolos aqui seguidos para a produção de anticorpos monoclonais-AcMn, foram baseados na técnica descrita pelos implantadores da tecnologia dos hibridomas, Köhler e Milstein (1975), com modificações para adequação aos nossos objetivos e condições de laboratório.

Para obtenção de linfócitos imunes foi utilizado para cada fusão celular um camundongo da linhagem endocruzada BALB/c, previamente imunizado. Três dias antes

da fusão foi dada uma dose do antígeno por via endovenosa como reforço (por via intraperitoneal para antígeno não solúvel). Antes do sacrifício, obteve-se sangue do animal por punção cardíaca, para estoque de soro imune.

Após remoção do baço do camundongo sob condições assépticas, este foi posto em placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Flow) pH 7,3 (ver 2.1.4.1). Este meio foi usado em todos os passos aqui descritos, de modo que será referido como meio de cultura e, quando acrescido de outras substâncias não comuns para todos os protocolos, serão dados os complementos.

Após maceração do baço, obteve-se uma suspensão de células que foram centrifugadas a 800x g por 5 min a temperatura ambiente. As células precipitadas foram ressuspendidas em 10 ml do meio de cultura e lavadas por centrifugação por mais duas vezes.

Durante as lavagens dos linfócitos, células de mieloma SP20-Ag-14, foram recuperadas de frascos de cultura e centrifugadas. Esta linhagem vinha sendo mantida em meio de cultura mais 10 % de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) em estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar. O meio de cultura foi trocado um dia antes da fusão celular para estimular as células que estavam em crescimento exponencial.

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, usando o corante Azul de Trypan (cora as células mortas), com o cálculo do número de células viáveis assim:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viáveis}}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados usados da câmara}} \times \text{diluição} \times 10^4 = \text{total}$$

de células viáveis em 1 ml de solução.

Os linfócitos e as células do mieloma foram misturados em proporção de 1:10 e centrifugados, sendo o sobrenadante desprezado e as células desprendidas da parede do tubo com leve agitação manual. Este tubo foi parcialmente submerso em água a 37°C para que fosse realizada a fusão dos linfócitos com as células de mieloma da seguinte forma:

- (a) No primeiro minuto, adição de 1 ml em gotas de uma solução de polietilenoglicol-PEG 1.500 (Sigma), a 50% em meio de cultura;
- (b) No segundo minuto, agitação leve do tubo;
- (c) No terceiro minuto, adição de 1 ml em gotas de meio de cultura previamente aquecido a 37°C;
- (d) No quarto minuto, adição de 2 ml em gotas de meio de cultura;
- (e) No quinto minuto, mais 4 ml em gotas do meio de cultura;
- (f) No sexto minuto, mais 8 ml em gotas do meio de cultura.

Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em concentração de  $10^6$  / ml em meio seletivo

-3

HAT (RPMI 1640 com hipoxantina (Sigma) ( $10 \times 10^{-6}$  M), timidina (Sigma) ( $1,6 \times 10^{-4}$  M) e aminopterina (Sigma) ( $4,0 \times 10^{-6}$  M) e 15 % de SFB). As células foram então postas em placas de cultura com 0,1 ml/cavidade em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

Três dias após a fusão as placas receberam com pipeta de Pasteur, uma gota/cavidade de meio HAT. No sexto dia, 50% do meio foi trocado por meio HAT fresco. No nono e no décimo primeiro dia, houve troca do meio HAT por meio HT (meio HAT sem aminopterina), seguindo então a manutenção dos hibridomas com meio de cultura mais 10% de SFB.

A análise da presença de hibridomas foi realizada em microscópio invertido, sendo eliminadas (por aspiração total do meio) as cavidades que não continham hibridomas.

## **2.6.2 Análise dos Hibridomas em Ensaio Imunoenzimático-ELISA**

Os hibridomas já visíveis a olho nu (a placa é vista por baixo contra a luz) foram marcados para coleta do sobrenadante e análise em ensaio imunoenzimático - ELISA.

As placas de ELISA foram sensibilizadas um dia antes com o antígeno na concentração de 10 µg de proteínas/ml de solução de tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 .

Os sobrenadantes de cada cavidade da placa contendo os hibridomas a serem testados, foram coletados sob

condições estéreis no momento do teste. Seguiu-se então o protocolo básico de ELISA (ver 2.4). Os hibridomas considerados positivos (valor de 3 a 4) foram expandidos para placas mais largas e fundas (capacidade de 500 ul) contendo 24 cavidades.

A rotina de testes seguiu-se até serem testados todos os hibridomas. Como em algumas cavidades existia mais de um clone de células, os negativos em ELISA só foram eliminados após um segundo teste, pois um clone negativo poderia ter "mascarado" o clone positivo que ainda estava em pequeno número de células.

Os hibridomas expandidos foram testados e caso confirmassem a positividade, postos em frascos de cultura e posteriormente congelados em nitrogênio líquido da seguinte forma:

- (a) Suspensão das células com meio de cultura e centrifugação;
- (b) Ressuspensão das células em criotubos (Corning), em 1 ml de meio de meio de cultura com 10% de SFB e adição de 1 ml de meio de congelamento (RPMI 1640 + SFB + Dimetilsulfóxido-DMSO (Inlab): 30%, 50% e 20% respectivamente), com as seguintes fases de congelamento:

TEMPO	TEMPERATURA
15 min	4° C

TEMPO	TEMPERATURA
15 min	0° C
60 min	-20° C
24 h	Fase gasosa do nitrogênio líquido
Após 24 h	Fase líquida do nitrogênio líquido (aproximadamente - 180° C).

Os hibridomas ficaram congelados até a fase de clonagem dos mesmos (ver 2.6.4).

### **2.6.3 Preparo de Placas de Cultura com Células de Exudato Peritoneal de Camundongo**

Um dia antes da clonagem dos hibridomas, foram preparadas placas de cultura com células de exudato peritoneal de camundongo-CEP da linhagem endocruzada BALB/c da seguinte maneira:

- (a) Sacrifício de camundongo não imunizado, por deslocamento cervical;
- (b) Injeção de 5 ml de meio de cultura na cavidade peritoneal do camundongo;
- (c) Recuperação do meio injetado por punção com seringa estéril de 5 ml;
- (d) Centrifugação após diluição em mais 5 ml de meio de cultura (2 vezes);
- (e) Ressuspensão em meio de cultura + 10% SFB em quantidade suficiente para concentração final de  $2 \times 10^5$  células/ml;



- (f) Células foram postas em placas de cultura de 96 cavidades, duas gotas/cavidade com pipeta de Pasteur e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar até o uso.

#### **2.6.4 Clonagem e Subclonagem dos Hibridomas Positivos**

Para real confirmação da positividade de uma colônia de hibridomas, fez-se uma clonagem desta e, quando necessária, uma subclonagem. Os hibridomas congelados foram aos poucos descongelados para clonagem e definição dos mesmos.

Para descongelamento dos hibridomas procedeu-se da seguinte forma:

- (a) Retirada do criotubo com hibridoma do nitrogênio líquido e imersão rápida em banho-maria (37°C). Após o degelo, diluição em 10 ml de meio de cultura e duas lavagens por centrifugação.
- (b) O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 7 ml do meio de cultura;
- (c) Após contagem das células em câmara de Neubauer, preparou-se uma suspensão contendo 10 células/ml de meio de cultura + 10% de SFB. Aliquotas de 100 ul foram postas em cada poço de placas com 96 cavidades (previamente

preparadas com CEP), sendo que para cada 1/3 da placa a suspensão foi diluída uma vez até completar toda a placa.

O restante das células descongeladas foram postas em frascos de cultura para produção de sobrenadante com anticorpos específicos ao parasita em estudo.

Quando necessária realizou-se a subclonagem de alguns clones, sendo o procedimento igual ao da clonagem. Os clones e subclones foram analisados por ELISA, e aqueles que deram resultados mais positivos foram expandidos e congelados. Os AcMn foram obtidos a partir do sobrenadante das culturas e estocados a 4°C.

## **2.7 Caracterização de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**

Foi utilizado o sistema de Laemmli (1970) para a análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio-SDS, um detergente aniônico.

O sistema compõe-se de duas partes, um gel de concentração maior de acrilamida (gel de corrida ou resolução) e um gel de menor concentração de acrilamida ("stacking gel" ou gel de concentração das proteínas).

As soluções usadas para um gel de concentração final de 12,5 % foram:

### Gel de resolução:

Acrilamida a 30 % (Sigma) volume = 7,5 ml  
Tris Hidróxido Metil Aminometano-Tris/HCl (Inlab)-  
3 M pH 8,3 volume = 2,3 ml  
Água bidestilada volume = 7,7 ml

Deaeração com bomba de vácuo e acréscimo de:

SDS a 10 % (Inlab) volume = 180 ul  
Tetrametilenodiamina-TEMED (Sigma) volume = 23 ul  
Persulfato de Amônio-APS a 10% (Inlab) volume = 225 ul

### Gel de concentração

Acrilamida a 20% volume = 2,0 ml  
Tris-HCl 1 M pH 6,8 volume = 1,25 ml  
Água bidestilada volume = 6,6 ml

Deaeração com bomba de vácuo e acréscimo de :

SDS 10% volume = 100 ul  
TEMED volume = 6 ul  
APS a 10% volume = 60 ul

O tampão de corrida utilizado para migração das proteínas foi o Tris-Glicina (Inlab) (0,25 M e 1,92 M respectivamente) pH 8,3 com 1% de SDS.

As amostras foram aplicadas com seringa Hamilton com o seguinte tampão de amostra:

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8  
SDS = 2%  
Glicerol (Inlab) = 10%  
2-Mercaptoetanol (Inlab) (quando sob condições redutoras) = 5%  
Azul de bromofenol (Reagen) 0,1%

Como marcadores de peso molecular foram utilizados:

IgG de camundongo, preparada por precipitação de imunoglobulina do soro com sulfato de amônio saturado (PM = 25 e 50 kDa sob condições redutoras), Albumina (Sigma, PM = 66 kDa) e Actina (Sigma, PM = 43 kDa).

## 2.7.1 Amostras utilizadas Para a Caracterização

As amostras utilizadas foram o extrato protéico solúvel de **Wuchereria bancrofti** (WBS) e o seu precipitado (WBPPT) sob condições redutoras. Para **Litomosoides carinii**, utilizou-se o extrato protéico de vermes adultos e o seu precipitado, LCSA e LCPPTA respectivamente, sob condições redutoras e não redutoras. Quando sob condições redutoras as amostras foram fervidas durante 90 s e em seguida aplicadas no gel.

131

### 2.7.1.1 Com Proteínas Radiodinadas - I

Para marcação de proteínas com o isótopo radioativo <sup>131</sup>I (Comissão Nacional de Energia Nuclear), contamos com a colaboração do Departamento de Biofísica da UFRGS, através da Prof<sup>a</sup>. Aida Seara Muradás.

A marcação de proteínas internas e de superfície de microfilárias de **W. bancrofti**, teve como objetivo detectar frações protéicas não detectáveis em gel de poliacrilamida com os métodos convencionais de coloração (Coomassie blue).

Foi utilizado o método de Greenwood e cols. (1963) com cloramina T, cujo protocolo básico é:

- (a) De 2-6 ug/25 ul de solução de proteínas, usar 25 ul da amostra diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5;
- (b) Acrescentar NaI <sup>131</sup> (37 µg);

(c) Acrescentar cloramina T (Bio-Rad), usar 20 ul diluído no mesmo tampão fosfato (2,0 mg/ml) por 3 a 5 min (preparar a solução no momento do uso),

As amostras utilizadas foram mfs. íntegras de *W. bancrofti* (amostra # 1, cerca de 50.000) e extrato de mfs. (amostra # 2, cerca de 50.000) após rompimento das mesmas em ultra som (ver 2.1.3) sem centrifugação.

As amostras marcadas radioativamente foram submetidas a eletroforese (conforme 2.7). Após a migração, os géis foram expostos a chapas de Raios X (Kodak) durante 6 a 36 h.

#### a) Imunoprecipitação

A partir de microfilárias radiodinadas, foi realizada a imunoprecipitação de proteínas segundo o protocolo:

(a) Em tubos Eppendorf, adição de anti-soro anti *W. bancrofti* ou anti *L. carinii*, diluído 1/50 em tampão PBS para volume final de 50 ul;

(b) Adição de 50 ul de sobrenadante da amostra contendo proteínas: internas e de superfície ou apenas proteínas de superfície;

(c) Incubação por 12 h a 4°C;

(d) Adição de imunoglobulina de coelho anti imunoglobulina de camundongo (diluída 1/2 em tampão PBS para volume final de 50 ul),

- (e) Incubação por 1 h a 37°C;
- (f) Centrifugação, 800x G por 90 s;
- (g) Retirada do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 20 ul de tampão de amostra sem 2-Mercaptoetanol (conforme 2.7);
- (h) Eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação conforme já descrito anteriormente.

## **2.8. Transferência de Proteínas ao Papel de Nitrocelulose - Western Blotting**

Para a transferência de proteínas em gel de poliacrilamida à folha de papel de nitrocelulose-NC, foi utilizada a técnica de Burnette (1981) com modificações.

Um "sanduíche" foi preparado com as seguintes camadas:

- (a) Uma folha porosa de polietileno;
- (b) Quatro folhas de papel filtro grosso;
- (c) Uma folha de papel filtro cromatograficamente puro;
- (d) Gel de poliacrilamida;
- (e) Uma folha de papel de nitrocelulose cortada no tamanho do gel;
- (f) Uma folha de papel filtro cromatograficamente puro;
- (g) Quatro folhas de papel filtro grosso ;
- (h) Uma folha porosa de polietileno.

O "sanduiche" foi preparado dentro de um tanque contendo tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20%) de modo a não existir bolhas de ar entre as camadas. Após isto o "sanduiche" foi inserido na cuba e esta completada com o mesmo tampão de transferência, ficando na seguinte ordem: ânodo - NC - Gel - cátodo. A transferência, foi realizada com 6 a 8 V/cm por 16 - 22 h a 4° C.

Após a transferência, o papel de NC foi retirado e uma amostra do mesmo contendo os marcadores de peso molecular foi corado com uma solução de Coomassie blue:

Coomassie blue R-250 (Inlab) = 0,2%  
Metanol (Inlab) = 50%  
Ácido Acético (Inlab) = 10%  
Água destilada em q.s.p 100 ml

**Solução descorante:**

Metanol = 90%  
Ácido Acético = 2%  
Água destilada em q.s.p 100 ml

O restante do papel de NC foi processado da seguinte forma:

- (a) O papel de NC foi cortado em "tiras" de acordo com cada amostra aplicada no gel;
- (b) As "tiras" foram postas em canaletas com solução bloqueadora, o bloto 5% (leite em pó desnatado, em tampão PBS) por 10 min com agitação horizontal;
- (c) Incubação por 12 h com anti-soro a ser testado diluído com bloto 1% (em geral 1:50) ou AcMn

- puro em agitador horizontal a 4°C;
- (d) Lavagem por 1 h (6 trocas/10 min cada) com PBS e na última troca com bloto 5%;
  - (e) Incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado à peroxidase, diluído com bloto 1% (1/500) com agitação horizontal a temperatura ambiente;
  - (f) Repetição de "d" (só PBS);
  - (g) Revelação com Diaminobenzidina (5 mg em 30 ml de PBS e 15 ul/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%);
  - (h) Inibição da reação por lavagem das "tiras" com H<sub>2</sub>O destilada;
  - (i) Secagem das "tiras" entre papéis filtros grossos.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Parasitas Obtidos

##### 3.1.1 *Wuchereria bancrofti*

Das diversas amostras de sangue coletados de indivíduos infectados, após filtragem e refiltragem cerca de 80% das microfilárias (mfs.) eram recuperadas. Os parasitas apresentavam viabilidade próxima a 100% e grande motilidade, quando observados sob microscópio invertido.

Nestas remessas, a média de mfs./ml de sangue foi de 600 (levando em conta o sangue coletado de 2 a 3 indivíduos). Entretanto, recebemos uma amostra de sangue de um só paciente (20 ml) que tinha 2.000 mfs./ml, em análise preliminar feita no CPqAM-FIOCRUZ-Recife (PE), sendo que conseguimos recuperar 1.640 mfs./ml deste sangue.

Quanto as remessas para os experimento de cultivo de mfs. obtivemos em geral o mesmo número médio de parasitas por ml de sangue.

### 3.1.2 Litomosoides carinii

Do total de vermes coletados em 17 roedores dos gêneros *Oryzomys* e *Akodon* em Torres (RS), obtivemos os seguintes resultados:

Número total de vermes adultos = 427 (90% fêmeas e 10% machos).

Do total de fêmeas:

Número médio de ovos/fêmeas =  $0,85 \times 10^5$

Número médio de embriões/fêmeas =  $0,34 \times 10^5$

A amostra vinda de Recife constou apenas de ovos e embriões de *L. carinii* (LCD/E), previamente extraídos de úteros de fêmeas adultas e continha um total de  $20,79 \times 10^5$  ovos e  $3,54 \times 10^5$  em 2ml de solução salina a 0,85%. A Figura 3.1 mostra LCD/E em diferentes fases de maturação.

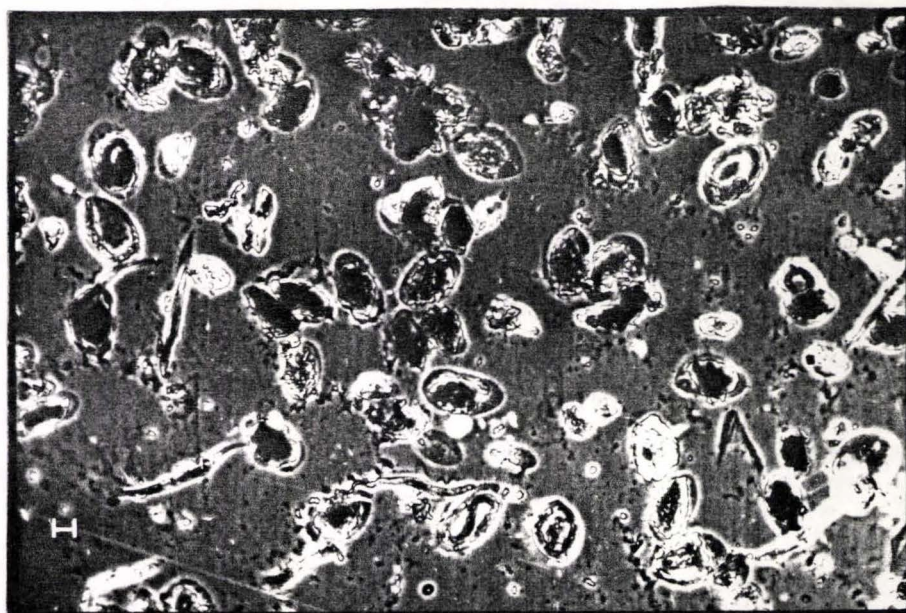


Figura 3.1 Ovos e embriões de *Litomosoides carinii* em diferentes fases de maturação fotografados em contraste de fase. A barra desta e das demais figuras equivale a 10 um.

As Figuras 3.2 e 3.3 mostram LCO/E isolados e em maior aumento para uma melhor visualização das diferentes fases de maturação.



Figura 3.2 Ovos de *Litomosoides carinii* em diferentes fases de maturação. As setas menores indicam ovos em fase inicial de maturação; a seta maior indica ovo em fase final de maturação já evidenciando o embrião. Coloração: Hematoxilina-eosina.

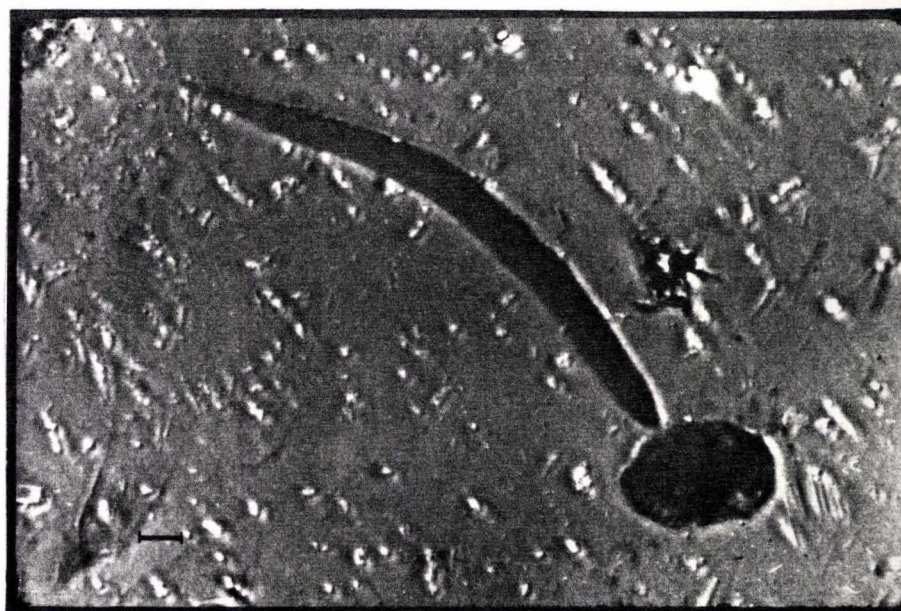


Figura 3.3 *Litomosoides carinii*. Comparação entre embrião maduro ou microfilária e ovo em fase inicial de maturação. Coloração: Hematoxilina-eosina.

## 3.2 Verificação de Produção de Anticorpos

### 3.2.1 Contra Antígenos de *W. bancrofti*

#### a) Em Camundongos Imunizados

Após a obtenção de soro de camundongos imunizados com duas injeções de diferentes preparações antigênicas de *W. bancrofti*, realizamos o ELISA e verificamos que uma placa sensibilizada com sobrenadante de extrato protéico solúvel (WBS, 5-10 µg/ml) reage bem com os soros anti WBS, anti WBT (extrato protéico total) ou com os anti WBI (mfs. íntegras) na diluição 1:100. As médias obtidas por densidade óptica (492 nm), neste e nos demais experimentos com leitura em densitômetro após ELISA com os referidos anti-soros, estão representadas da seguinte forma:

$\bar{X} \div \bar{X}$  controle negativo = densidade óptica média em cada grupo, dividida pelo valor médio encontrado nos controles negativos:

ANTIGENO	ANTI-SORO	$\bar{X} \div \bar{X}$ CONTROLE NEGATIVO
WBS	ANTI WBS	1,88
WBS	ANTI WBI	3,67
WBS	ANTI WBT	5,29

Os resultados acima obtidos foram repetidos a cada coleta de sangue do camundongo e obtenção do soro inune. Os melhores anti-soros (de reação mais intensa) passaram a ser utilizados como controles positivos em outros ELISA.

Num outro ELISA verificamos que o soro imune de camundongo reagiu contra soro humano normal, ou seja houve reconhecimento de proteínas do hospedeiro humano pelos anticorpos presentes nos soros imunes de camundongos.

Num outro experimento testamos a reação de soros de camundongos imunizados com WBT contra 42 soros humanos imunes (SHI, de pacientes com filariose bancroftiana), na tentativa de detectar antígenos de **W. bancrofti** nestes últimos. O resultado foi um alto título de anticorpos contra antígenos de **W. bancrofti** presentes nos SHI:

$$\bar{X} \text{ dos anti-soros} = 0,373$$

$$\bar{X} \text{ do controle negativo} = 0,225$$

#### **b) Em Pacientes com Filariose Bancroftiana**

Soros humanos imunes (SHI) de 6 pacientes com sintomas clínicos de filariose bancroftiana, foram usados em ELISA para verificar a presença de anticorpos contra antígenos de WBS (10 ug/ml) e excretados e / ou secretados (E/S, 100 ul/cavidade da placa) durante cultivo **in vitro**.

ANTIGENO	$\bar{X}$ SHI ( $\bar{X} \div \bar{X}$ CONTROLE NEGATIVO)
WBS	0,141
E/S	0,059

A média mais alta entre os SHI utilizados contra WBS foi de um paciente com eosinofilia pulmonar tropical e contra antígenos E/S com o soro de um paciente com edema de

pênis. Mesmo levando em consideração a média de todos os soros a reação não foi forte, ou seja, não havia anticorpos circulantes em título alto naqueles soros.

### 3.2.2 Contra Antígenos de *Litomosoides carinii*

Os testes ELISA dos anti-soros anti *L. carinii* (LC) obtidos após 5 imunizações de 50 ug/camundongo, via intraperitoneal (Grupo 7, Tabela 2.7), forneceram-nos os seguintes resultados:

ANTIGENO	DILUIÇÃO DOS ANTI-SOROS	$\bar{X}$ ANTI-SORO ANTI LC
LCTA	1/50	1,316
LCTA	1/100	0,254
LCTA	1/200	0,583

Num outro experimento utilizamos antígenos solúveis de vermes adultos de *L. carinii* (LCSA) para reagir com soro humano imune de pacientes com sintomas clínicos de filariose bancroftiana, com o objetivo de verificar se os soros humanos reconheceriam antígenos de *L. carinii*.

Os resultados indicaram forte reação dos SHI contra os antígenos de *L. carinii*:

$$\bar{X} \text{ do SHI} = 0,91$$

$$\bar{X} \text{ do controle positivo (anti LC)} = 0,514$$

$$\bar{X} \text{ do controle negativo (SNCa)} = 0,131$$

Um outro experimento testamos a reatividade ou não

do soro não imune de rato (hospedeiro definitivo de *L. carinii*) contra LCSA. Não houve reação. Os soros comportaram-se como soros normais (negativos).

**a) Resposta Imune a Diferentes Doses de Imunização Com Ovos e Embriões (O/E) de *L. carinii***

A Tabela 3.1 mostra os resultados obtidos com o ELISA com soros de camundongos após 3 imunizações com O/E íntegros de *L. carinii*. Cada grupo consistiu de 3 a 4 animais e o número de doses e vias de imunizações já foram descritos na Tabela 2.7 (material e métodos).

Como pode ser observado, a resposta é dose-dependente, e parece ser mais intensa após imunização por via endovenosa que intraperitoneal.

TABELA 3.1 - MEDIA DOS SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM DIFERENTES DOSES DE OVOS/EMBRIÕES E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES DE CADA GRUPO EM ELISA.

GRUPO/VIA*	$\bar{X} \div \bar{X}$ CONTROLE NEGATIVO	DESVIDO PADRÃO
1 /IP	2,37	0,26
2 /EV	2,61	0,32
3 /IP	3,22	1,93
4 /EV	3,59	0,92
5 /IP	4,35	1,30
6 /EV	7,00	1,92

\* IP, intraperitoneal; EV, endovenosa  
 $\bar{X}$  do controle negativo (492 nm) = 0,09  
 $\bar{X}$  do controle positivo (492 nm) = 0,58

### 3.2.3 Reatividade Cruzada Entre *W. bancrofti* e *L. carinii*

Os resultados obtidos em ELISA com antígenos de *W. bancrofti* e reação com anti-soros de *L. carinii* ou o contrário estão na Tabela 3.2. Diluição dos soros = 1:100.

TABELA 3.2 - REATIVIDADE CRUZADA ENTRE ANTIGENOS DE *W. bancrofti* e *L. carinii*

GRUPO	ANTIGENO	SORO ANTI <i>L. CARINII</i> $\bar{X} \div \bar{X}$ CONTROLE NEGATIVO	SORO ANTI <i>W. bancrofti</i> $\bar{X} \div \bar{X}$ CONTROLE NEGATIVO
1	<i>L. carinii</i>	5,42	2,32
2	<i>W. bancrofti</i>	2,38	12,80

$\bar{X}$  do controle negativo (492 nm) *W. bancrofti* = 0.049; *L. carinii* = 0.138;  $\bar{X}$  do controle positivo (492 nm): *W. bancrofti* = 0.644; *L. carinii* = 0.759.

### 3.3 Cultivo *in vitro* de Microfilárias

#### 3.3.1 Experimento # 1: Cultivo de Microfilárias a 37°C Com 5% de CO<sub>2</sub> no Ar

A verificação da viabilidade das mfs. neste experimento foi feita a partir do grau de motilidade que as mesmas apresentam durante o cultivo.

Os resultados obtidos neste experimento estão representados na Figura 3.4. De modo geral, o meio 199 foi mais eficiente na manutenção das mfs. sendo seguido pelo meio RPMI 1640. O meio MEM mostrou-se incapaz de manter a viabilidade das mfs. por mais de 4 dias, em qualquer condição de cultivo.



Com a adição de SFB ou SHN, a viabilidade das culturas mantidas com 199 ou RPMI 1640, foi semelhante (em torno de 8 dias), bem como a sua meia vida (4 a 5 dias). A adição de SHN e açúcares e ácidos orgânicos (aao) aumentou ainda mais a viabilidade das culturas mantidas com estes meios, onde havia ainda 5-10% de mfs. vivas ao final do experimento.

Foi observado ainda que em relação à motilidade dos parasitas, esta variava desde seu valor máximo até o mínimo (5-0 respectivamente) à medida que as mfs. perdiam sua viabilidade (dados não ilustrados). Alterações morfológicas nos parasitas não foram observadas.

### **3.3.2 Experimento # 2: Cultivo de Microfilárias a 28° C Sem CO<sub>2</sub> ou a 37° C Com 5% CO<sub>2</sub> no Ar.**

Conforme ilustrado nas Figuras 3.5 e 3.6 nas placas mantidas a 28° C a viabilidade das culturas feitas com o meio 199 foi superior às com o meio RPMI 1640 na ausência de soro, embora a meia vida tenha sido aproximadamente a mesma. A adição de aao não modificou a viabilidade ou meia-vida das culturas, enquanto ambos os critérios mostraram aumento após a adição de SFB ou SHN com aao.

Apenas nas culturas mantidas a 28° C foram observadas modificações morfológicas nos parasitas (descritas no item, 3.3.5).

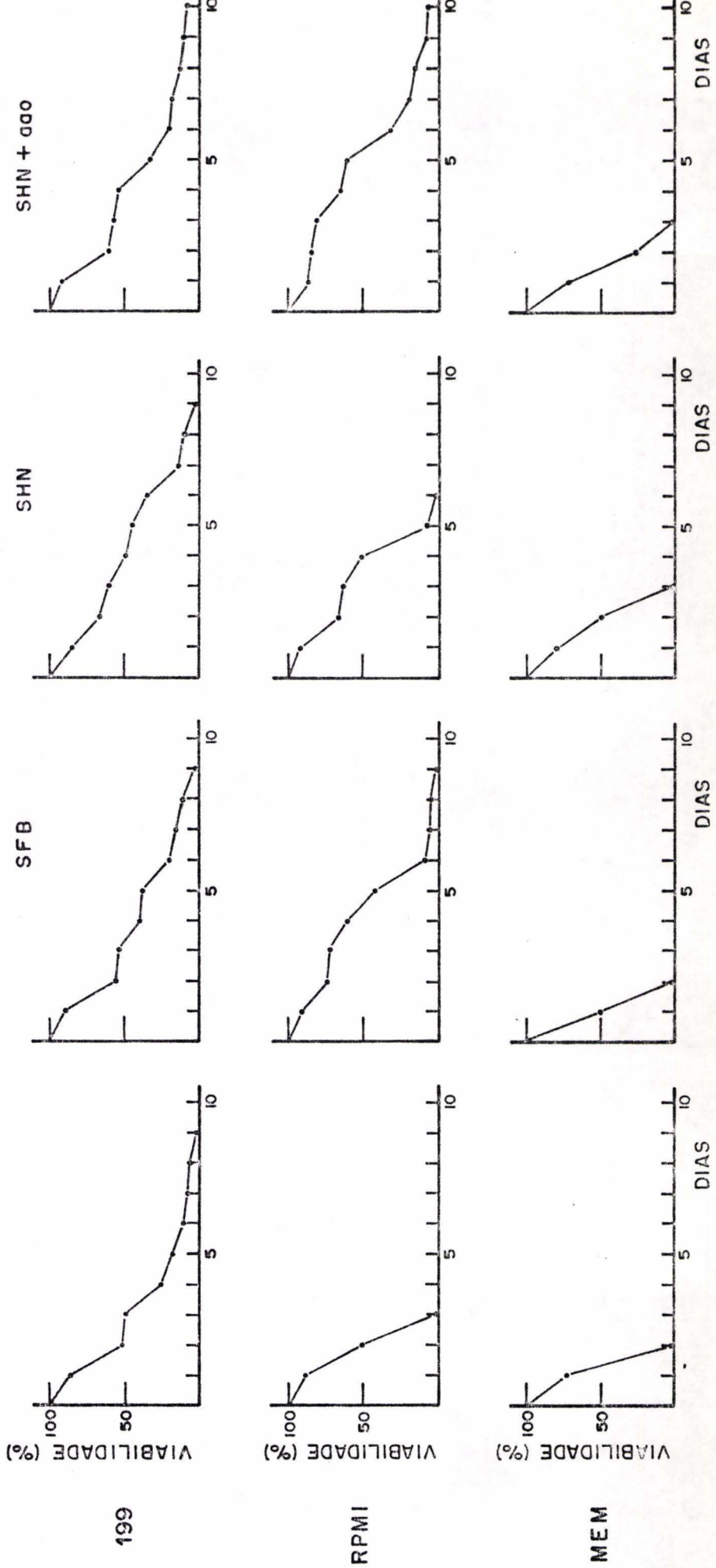


Figura 3.4 Viabilidade de microfilárias em meio 199, RPMI 1640 ou MEM com ou sem complementos a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> no ar.

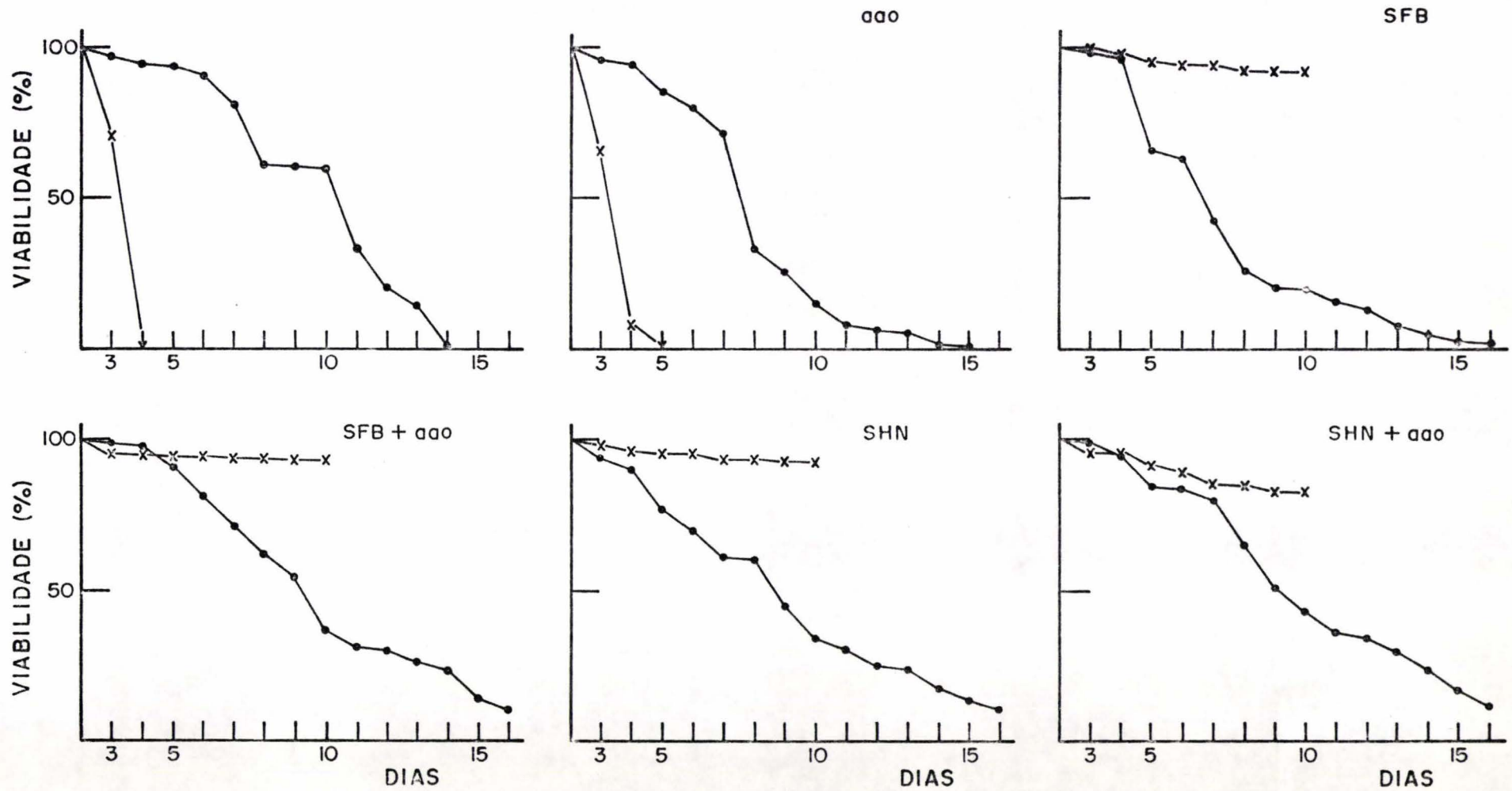


Figura 3.5 Viabilidade de microfilarías em meio 199 com ou sem complementos a 28°C sem CO<sub>2</sub> no ar ou a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> no ar. x—x 37°C —●— 28°C

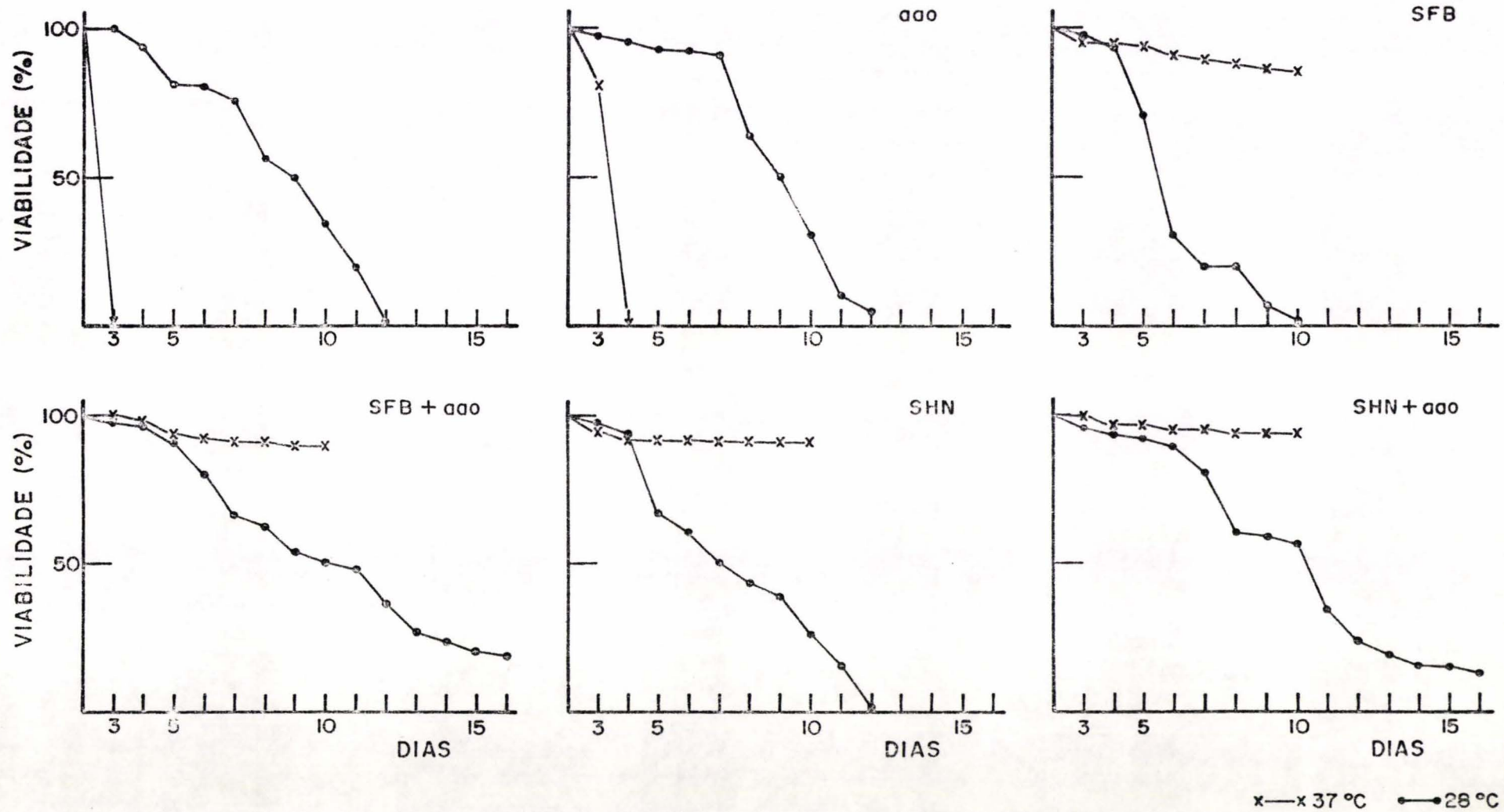


Figura 3.6 Viabilidade de microfilarías em meio RPMI 1640 com ou sem complementos a 28°C sem CO<sub>2</sub> no ar ou 37°C com 5% CO<sub>2</sub> no ar

Nas placas mantidas a 37°C o experimento foi interrompido no sétimo dia, por ter ocorrido uma contaminação das culturas por fungos. Entretanto, pode ser observado que a viabilidade e meia vida das microfilárias foi menor que a das culturas mantidas a 28°C, na ausência de soro, mesmo após a adição de aao. O número de mfs. vivas nas culturas mostrou-se entretanto superior nesta temperatura após a adição de SFB ou SHN com ou sem aao.

A adição neste experimento de um extrato de drosófilas em algumas cavidades da placa não provocou alterações nas mfs..

### **3.3.3 Experimento # 3: Cultivo de Microfilárias a 28°C ou a 37°C sem CO<sub>2</sub> no Ar ou a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no Ar em Placas Com ou Sem Células de Exudato Peritoneal Murino (CEP)**

A Tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos nestes experimentos, que foram seguidos durante 23 dias. Nas culturas mantidas a 37°C ou a 28°C sem CO<sub>2</sub> no ar, a morte das mfs. ocorreu em 24 h, em qualquer condição de cultivo. A 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar a morte das mfs. ocorreu em 24 h na ausência de soro ou células de exudato peritoneal. Com a adição de SFB ou SHN, em presença ou ausência de CEP, a viabilidade das mfs. permaneceu próxima a 100%, e sua motilidade máxima, até o final do experimento. O mesmo resultado foi encontrado quando as mfs. foram

cultivadas em ausência de soro mas sobre uma camada de células.

TABELA 3.3 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROFILÁRIAS DE *Wuchereria bancrofti*, EM MEIO RPMI 1640 SEM HEPES

Temperatura	CO2	Complementação	CEP*	Viabilidade (%)	
				Dia 1	Dia 23
37°C	5 %	-	-	0	0
		-	+	97	95
		15 % SFB	-	98	91
		15 % SFB	+	100	95
		15 % SHN	-	100	94
		15 % SHN	+	99	91
37°C	-	-	-	0	0
		-	+	0	0
		15 % SFB	-	0	0
		15 % SFB	+	0	0
		15 % SHN	-	0	0
		15 % SHN	+	0	0
28°C	-	-	-	0	0
		-	+	0	0
		15 % SFB	-	0	0
		15 % SFB	+	0	0
		15 % SHN	-	0	0
		15 % SHN	+	0	0

\* CEP, células de exudato peritoneal; -, ausência; +, presença.

#### 3.3.4 Experimento # 4: Cultivo de Microfilárias em Frascos

Os resultados obtidos com os cultivos em frascos de cultura foram de modo geral semelhantes aos obtidos com o cultivo das mfs. em placas, de modo que excluimos ilustrações.

### 3.3.5 Experimento # 5: Diferenciação de Microfilárias

Os resultados sobre diferenciação de mfs. foram obtidos a partir dos mesmos experimentos utilizados nos itens anteriores.

Nos cultivos a 37°C não foram observadas modificações morfológicas nos parasitas, exceto pela perda da bainha em uma proporção dos mesmos (Figura 3.7).



Figura 3.7 Diferenciação *in vitro* de microfilárias. As setas indicam algumas bainhas liberadas pelos parasitas em meio 199 ou em RPMI 1640 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

Nas culturas mantidas a 28°C em meio 199 ou RPMI 1640 contendo HEPES (conforme Tabela 2.2) foram observadas várias modificações na forma e comprimento das mfs.. Esta diferenciação ocorreu de forma semelhante nos dois meios de cultura utilizados e a Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos com o meio 199.

TABELA 3.4 DIFERENCIAÇÃO DE MICROFILÁRIAS DE *W.bancrofti* DURANTE CULTIVO EM MEIO 199 COMPLETO + HEPES, EM TEMPERATURA DE 28°C.

Complementação*	Forma	dias										
		3	4	5	6	7	8	10	11	13	14	16
---	I	100	93	91	91	84	83	83	82	82	-	-
	II	0	7	9	9	16	17	17	18	18	-	-
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
aao	I	98	97	93	93	91	88	84	84	75	-	-
	II	2	3	7	7	9	12	16	16	25	-	-
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
20 % SFB	I	100	92	91	76	54	42	37	16	8	8	5
	II	0	8	9	18	26	26	28	47	31	27	22
	III	0	0	0	6	17	23	23	25	23	19	21
	IV	0	0	0	0	3	9	12	12	38	46	52
20 % SFB + aao	I	96	87	74	67	55	48	32	21	16	15	12
	II	4	13	21	28	35	28	36	28	28	24	15
	III	0	0	5	5	8	17	22	29	20	20	15
	IV	0	0	0	0	2	7	10	22	36	41	58
20 % SHN	I	100	96	82	62	43	32	23	18	11	7	5
	II	0	0	12	22	41	47	51	54	18	20	12
	III	0	0	6	16	16	13	18	14	48	31	16
	IV	0	0	0	0	0	8	8	14	23	42	67
20 % SHN + aao	I	88	85	73	70	58	42	31	32	26	19	8
	II	12	15	27	22	32	27	29	26	37	25	21
	III	0	0	0	8	10	14	23	29	20	32	29
	IV	0	0	0	0	0	17	17	13	17	24	42

\* aao, açúcares e ácidos orgânicos; SFB, soro fetal bovino; SHN, soro humano normal.  
 Obs: As culturas foram analisadas diariamente, do 3º ao 16º dia, sendo registrada a porcentagem parasitas vivos em cada forma de diferenciação (I a IV).

Nos cultivos onde não houve complementação ou apenas a adição de aao, houve apenas a passagem da forma I (conforme ocorre no sangue) para a forma II, (perda da bainha), com o desembainhamento feito pela porção anterior ou posterior do parasita (Figuras 3.8 e 3.9). A adição de



TABELA 3.4 DIFERENCIAÇÃO DE MICROFILÁRIAS DE *M. bancrofti* DURANTE CULTIVO EM MEIO 199 COMPLETO + HEPES, EM TEMPERATURA DE 28°C.

Complementação*	Forma	dias										
		3	4	5	6	7	8	10	11	13	14	16
---	I	100	93	91	91	84	83	83	82	82	-	-
	II	0	7	9	9	16	17	17	18	18	-	-
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
aao	I	98	97	93	93	91	88	84	84	75	-	-
	II	2	3	7	7	9	12	16	16	25	-	-
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
20 % SFB	I	100	92	91	76	54	42	37	16	8	8	5
	II	0	8	9	18	26	26	28	47	31	27	22
	III	0	0	0	6	17	23	23	25	23	19	21
	IV	0	0	0	0	3	9	12	12	38	46	52
20 % SFB + aao	I	96	87	74	67	55	48	32	21	16	15	12
	II	4	13	21	28	35	28	36	28	28	24	15
	III	0	0	5	5	8	17	22	29	20	20	15
	IV	0	0	0	0	2	7	10	22	36	41	58
20 % SHN	I	100	96	82	62	43	32	23	18	11	7	5
	II	0	0	12	22	41	47	51	54	18	20	12
	III	0	0	6	16	16	13	18	14	48	31	16
	IV	0	0	0	0	0	8	8	14	23	42	67
20 % SHN + aao	I	88	85	73	70	58	42	31	32	26	19	8
	II	12	15	27	22	32	27	29	26	37	25	21
	III	0	0	0	8	10	14	23	29	20	32	29
	IV	0	0	0	0	0	17	17	13	17	24	42

\* aao, açúcares e ácidos orgânicos; SFB, soro fetal bovino; SHN, soro humano normal.  
Obs: As culturas foram analisadas diariamente, do 3º ao 16º dia, sendo registrada a porcentagem parasitas vivos em cada forma de diferenciação (I a IV).

Nos cultivos onde não houve complementação ou apenas a adição de aao, houve apenas a passagem da forma I (conforme ocorre no sangue) para a forma II, (perda da bainha), com o desembainhamento feito pela porção anterior ou posterior do parasita (Figuras 3.8 e 3.9). A adição de

SFD ou SHN, acompanhado ou não de aao, causou diferenciação posterior das mfs. para as formas III (Pré-"salsicha"), e IV (Figuras 3.10 e 3.11). Algumas destas formas mais diferenciadas apresentaram vacúolos geralmente de localização anterior. Em alguns casos foram observadas larvas que alcançaram a forma de pré-"salsicha" sem desembainhamento completo. A Figura 3.12 apresenta aspectos de bainhas liberadas pelas mfs. *in vitro*.

O aparecimento de granulações, verificado em cerca de 58% das mfs., mostrou-se associado à perda de viabilidade.

A Figura 3.13 apresenta uma comparação entre os 4 tipos de diferenciação das mfs. cultivadas *in vitro*.



Figura 3.8 Diferenciação *in vitro* de microfilarías. Estádio I, microfilaría conforme ocorre no sangue. As setas indicam a bainha visível na porção anterior e na posterior do parasita.

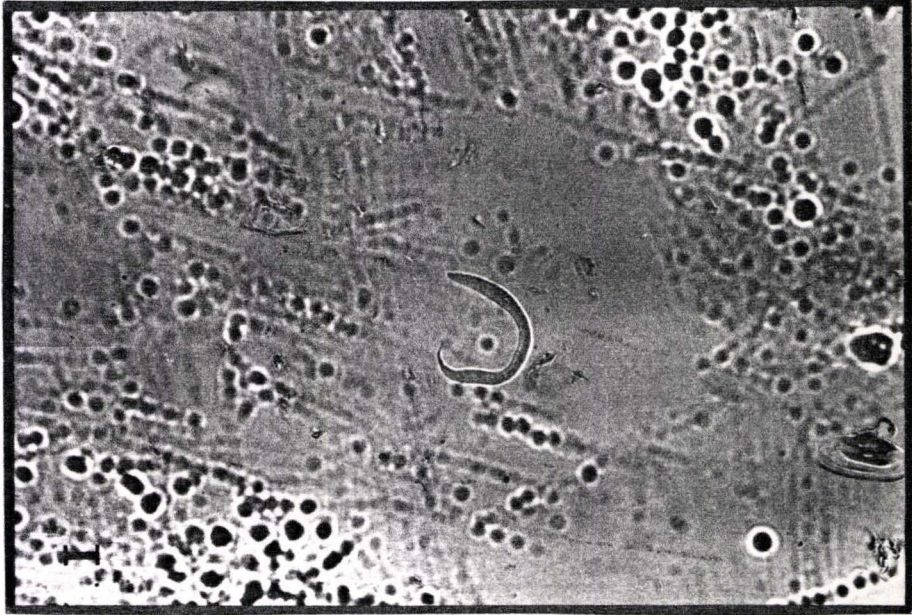


Figura 3.9 Diferenciação *in vitro* de microfilárias. Estádio II. O parasita apresenta-se menor, mais grosso e sem bainha (quase sempre).

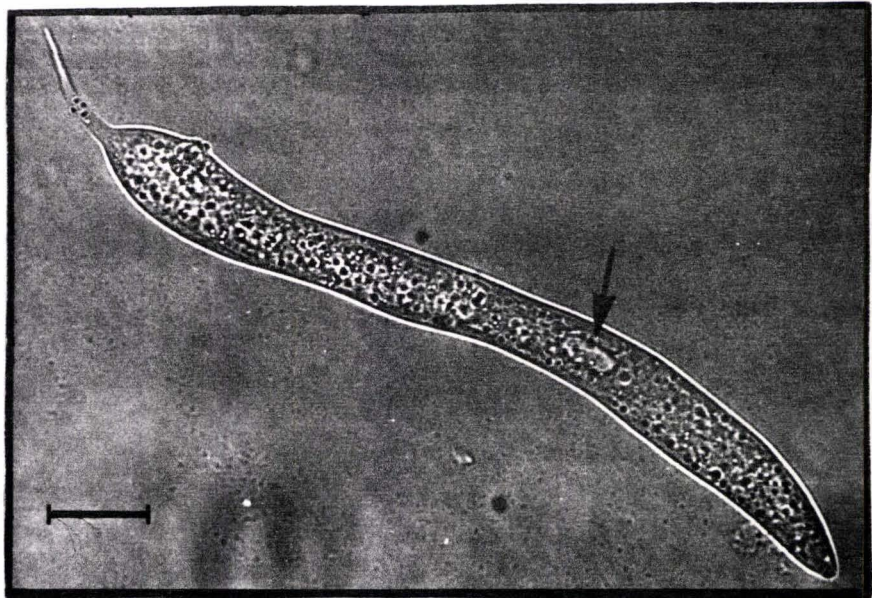


Figura 3.10 Diferenciação *in vitro* de microfilárias. Estádio III (Pré-"salsicha"). A seta indica 1 vacúolo de localização mais anterior.

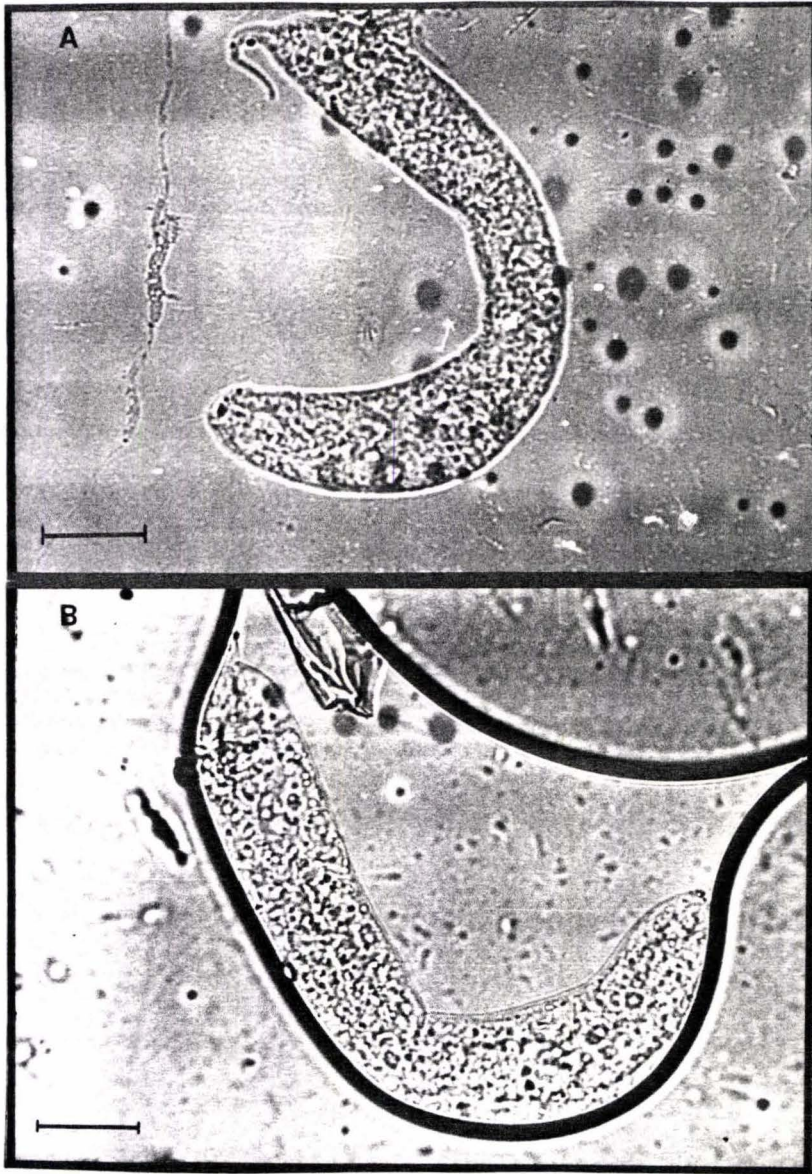


Figura 3.11 Diferenciação *in vitro* de microfilarias. A e B: Aspectos do Estádio IV ("salsicha").

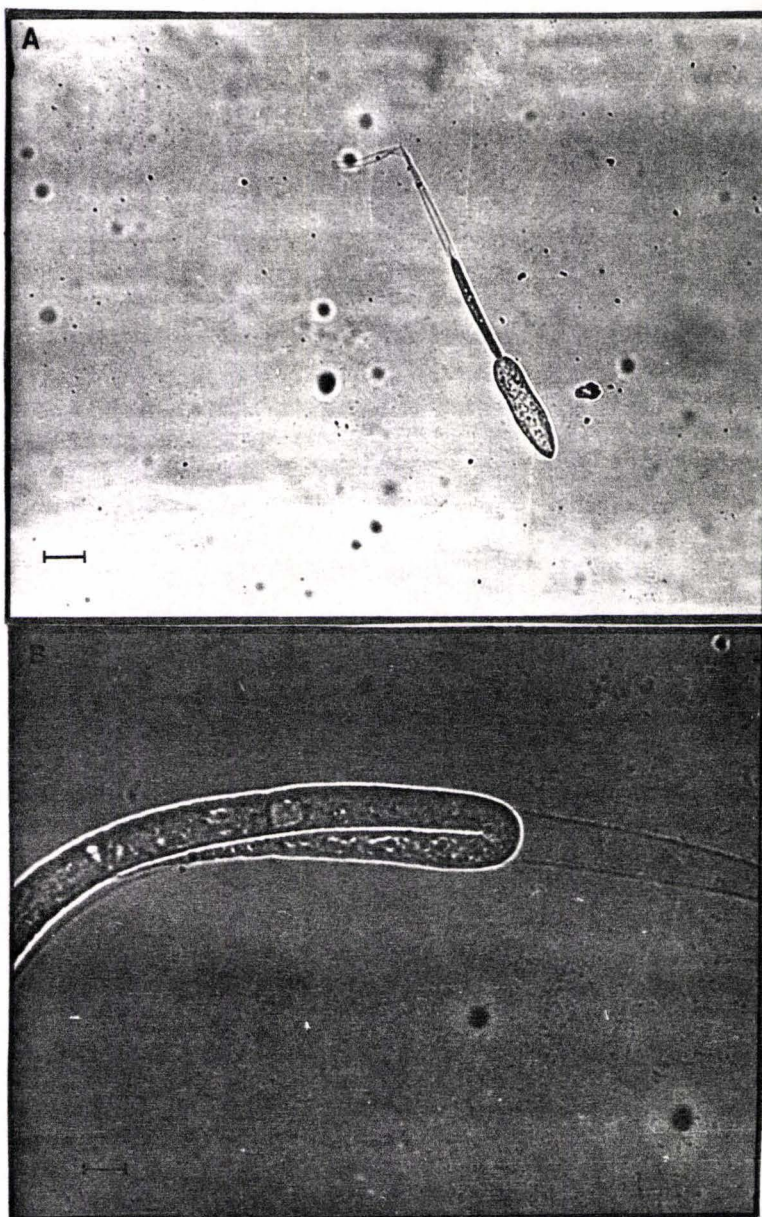


Figura 3.12 Diferenciação *in vitro* de microfíliarias. A e B: Aspectos de desembainhamento de microfíliarias durante cultivo em meio 199 ou RPMI 1640 a 28°C.

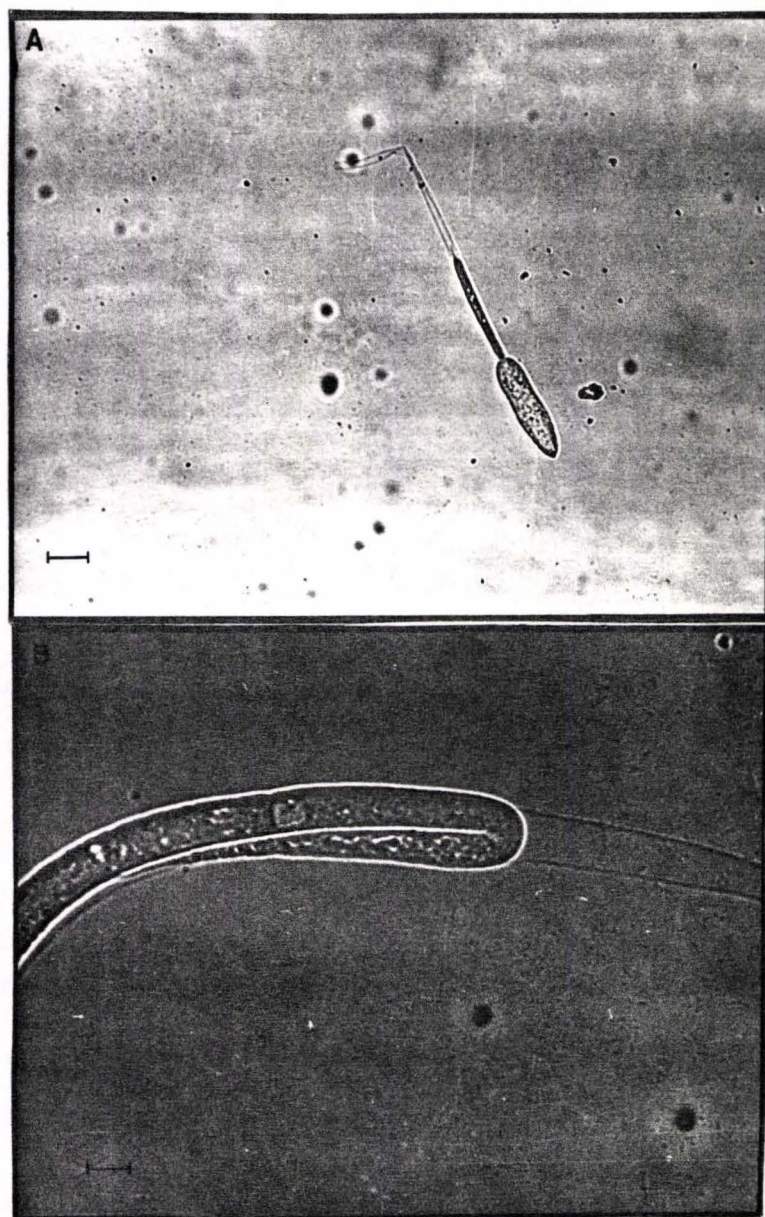


Figura 3.12 Diferenciação *in vitro* de microfíliarias. A e B: Aspectos de desembainhamento de microfíliarias durante cultivo em meio 199 ou RPMI 1640 a 28°C.

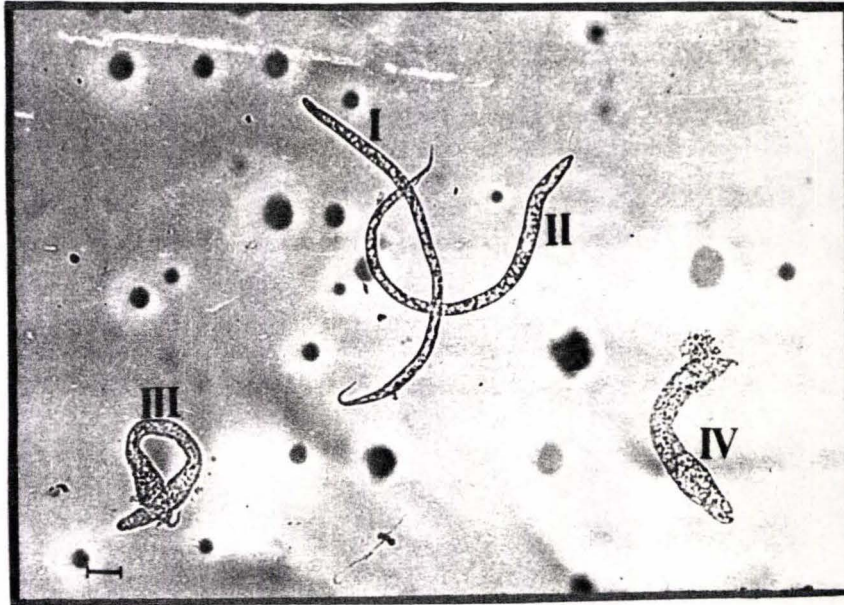


Figura 3.13 Diferenciação *in vitro* de microfíliarias. Comparação entre os 4 tipos (I, II, III, IV) de diferenciação do parasita durante o cultivo em meio 199 ou RPMI a 28°C.

Quanto à motilidade dos parasitas, observou-se uma diminuição à medida que o processo de diferenciação prosseguiu. Esta diminuição entretanto diferiu daquela associada à perda de viabilidade, na qual os movimentos passaram a ser espamódicos. Durante a diferenciação, as mfs. mantiveram a flexibilidade. A maior parte das larvas na forma IV apresentaram movimento apenas de cabeça e/ou cauda. Apenas uma das culturas (meio 199 complementado com SHN e aao) foi acompanhada além do décimo sexto dia. Nesta, no vigésimo terceiro dia foi observada uma pequena proporção de parasitas alcançando uma forma posterior de diferenciação, com a formação de lóbulos caudais e movimentação helicoidal acompanhada de um pequeno aumento no comprimento. A cultura foi perdida por contaminação antes que fosse feito o registro fotográfico.

### 3.3.6 Experimento # 6: Cultivo de Microfilárias com CEP em Presença de Soro Imune

Os resultados deste experimento foram obtidos durante 11 dias de cultivo. Não houve modificações morfológicas nas mfs., exceto pelo desembainhamento de parte delas. Aspectos referentes à aderência de CEP à mfs. em cultura estão na Figura 3.14 (A e B).

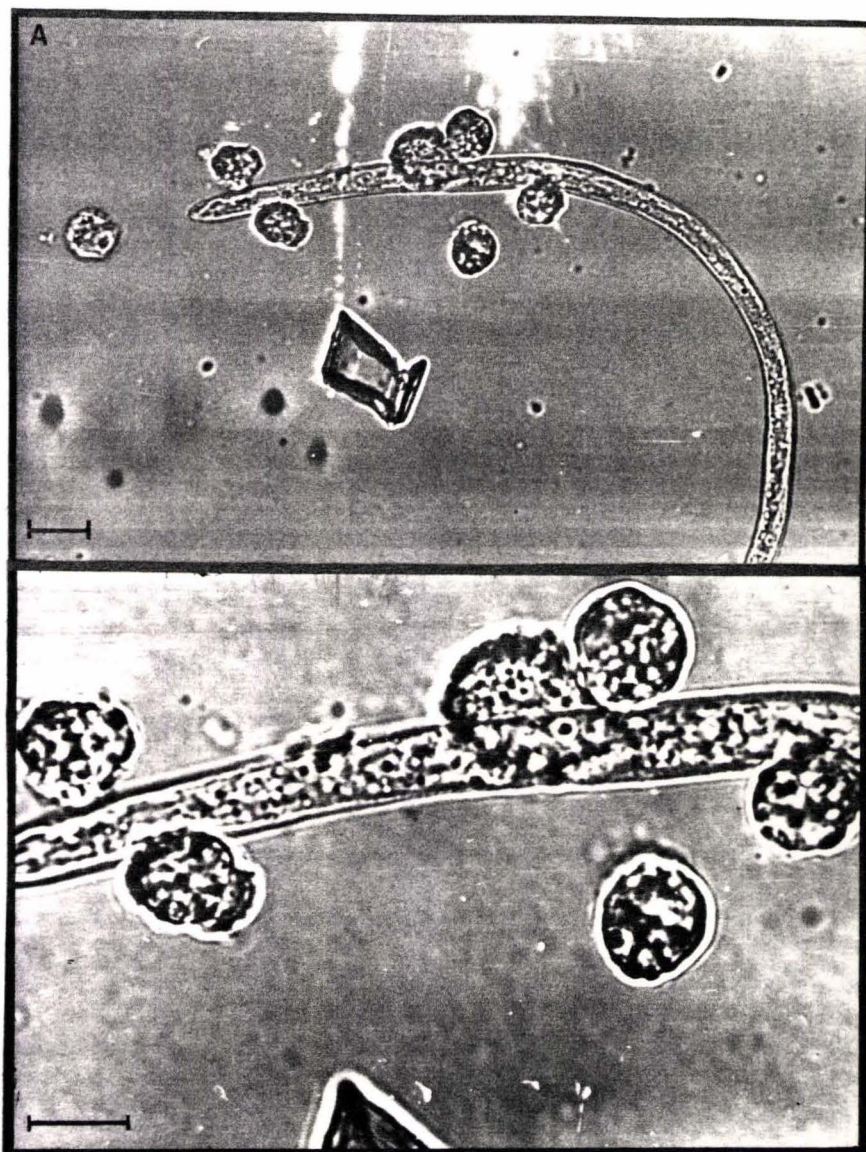


Figura 3.14 Cultivo *in vitro* de microfilárias. A e B: Aspectos de aderência de células de exudato peritoneal murino à microfilária.



diluições de 1/20 e 1/80 e ocorreu também quando o soro de camundongo não imune foi empregado;

(d) A maior parte deles não causou alteração na viabilidade das culturas, que se manteve em torno de 90-100%. Foram detectados 2 soros que causaram uma diminuição na viabilidade das microfilárias: o soro número 6, em presença do qual e após a adição de complemento a viabilidade caiu para 42% no dia 7; e o soro número 42, que diminuiu a viabilidade da cultura para 45% no dia 7 sem complemento e que, com a adição deste reagente, causou a morte de 100% das mfs. em um período de 24 horas. Estes dois soros foram testados novamente em outro experimento (dados não ilustrados), com o mesmo resultado. Os demais soros não causaram uma diminuição significativa no número de mfs. vivas, embora quatro deles (números 31, 68, 78 e 116) tenham demonstrado algum efeito negativo sobre a motilidade dos parasitas;

(e) Vários soros humanos causaram aderência das CEP a mfs.. Uma análise da porcentagem de aderência em presença de soro fresco no dia 7 do experimento mostrou que em 12 culturas havia células aderidas em 10 a 30% das mfs., enquanto em 11 culturas havia de 30 a 60%, e em 8 culturas havia mais de 60% de mfs. com células aderidas. Os demais soros não tiveram efeito significativo. Em várias das culturas, a porcentagem de aderência foi maior em presença do soro fresco de camundongo utilizado como fonte de complemento. De

modo geral, a porcentagem de aderência aumentou do dia 1 para o dia 7. Em apenas um caso (soro número 65) este valor passou de 80 para 10% do dia 3 para o dia 7;

(f) Enquanto a porcentagem média de aderência considerando-se todos os soros humanos de pacientes foi de 27,5% no dia 7 com adição de soro fresco, observou-se que a porcentagem média de aderência com o soro de pacientes com EPT foi de 43,1%, Quilúria = 48,7% e Hipereosinofilia = 44,8% a de pacientes assintomáticos foi de 25,3%. No entanto como o número de soros de cada sintoma era pequeno e diferente, realizou-se a análise estatística para verificar o grau de relação entre o nível de eosinófilos/mm de sangue, de pacientes sintomáticos ou assintomáticos (antes do tratamento com Dietilcarbamzina-DEC)(Tabela 2.7), com a porcentagem de aderência de CEP à mfs. no dia 7 (Tabela 3.5) após uso dos soros dos mesmos em cultura. Assim, a partir das hipóteses:

$H_0: p = 0$  Não existe correlação entre as variáveis.  
 $H_1: p \neq 0$  Existe correlação entre as variáveis.

Nossos resultados foram:

Nº de observações da amostra = 30      GL = 28

Correlação (r) = 0,0362      t-teste = 0,192

O "t" obtido revelou que não houve correlação significativa ao nível de 5%, aceitou-se portanto a hipótese

$H_0: p = 0$ .

(1) Exceto para o soro nº 42, onde foi considerado o valor obtido sem a adição de soro fresco, e para o soro nº 65, analisado no dia 3.

Outro resultado relevante diz respeito as culturas feitas com soro de pacientes portadores de eosinofilia antes do tratamento com DEC, cuja porcentagem média de aderência foi citada acima, e durante ou após este tratamento, quando foi observado um valor de apenas 7,5%. Por outro lado, o soro de um paciente portador de Hipereosinofilia e tratado com Pantelmim induziu 65% de aderência.

### 3.3.7 Experimento # 7: Detecção de Proteínas Excretadas e/ou Secretadas por Microfilárias Durante o Cultivo *In Vitro*

A análise preliminar dos antígenos E/S sem prévia concentração, não revelou (em ELISA) a presença destes antígenos já que a densidade óptica (492 nm) média dos anti-soros foi igual a média do controle negativo (sobrenadante de SP20-Ag-14) ou seja de 0,06. No entanto, quando realizamos a concentração do antígeno, vários soros policlonais de camundongos previamente imunizados com antígenos de *W.bancrofti*, detectaram o antígeno filárico, produto de E/S.

A reação dos soros contra antígenos E/S foi mais forte quando aumentamos o tempo de incubação de cada etapa do ELISA, ou seja, onde costumávamos incubar por 1 h a temperatura ambiente ou a 37°C foi incubado por 2 h.

Foram testados também AcMn contra estes antígenos

mas os resultados destes reagentes serão dados juntamente com os da produção de AcMn.

### 3.4 Produção de Anticorpos Monoclonais - AcMn

#### 3.4.1 Contra Antígenos de *W. bancrofti*

A produção de AcMn contra mfs. de *W. bancrofti* foi obtida após vários experimentos de fusão celular.

Os dados seguintes referem-se a uma fusão bem sucedida e na qual conseguimos isolar alguns clones que secretam imunoglobulinas específicas ao parasita em estudo:

Antígeno: Microfilárias íntegras de *W. bancrofti*

Dose: 3 doses de 200 mfs. com intervalos de 15 dias

Via: Intraperitoneal

Positividade do soro em ELISA: +++ (três vezes mais forte a reação em relação ao controle negativo)

Porcentagem de Hibridomas no total de Placas de Cultura : 63,3%

Porcentagem de Hibridomas Positivos Para Antígenos de *W. bancrofti*: 6,9%

Do total de hibridomas que reagiram com antígenos solúveis de *W. bancrofti* (WBS) em ELISA, obtivemos os seguintes resultados:

Hibridomas anti WBS: 3H4; 3E9; 3G4; 4F4; 4H2; 4H5; 5C6; 6E2; 7D4 e 7E3.

Destes hibridomas quatro foram clonados (3H4, 4H2,

6E2 e 7E3) sendo que em três deles foi realizada a leitura por densidade óptica (492 nm) conforme a Tabela 3.6.

TABELA 3.6 REAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI *Wuchereria bancrofti* CONTRA ANTÍGENOS SOMÁTICOS - WBS, E ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS - E/S DE *W. bancrofti* E REATIVIDADE CRUZADA COM *Litomosoides carinii* - LCSA, EM ELISA

CLONE	$\bar{X} \div \bar{X}$ controle negativo Antígeno = WBS	$\bar{X} \div \bar{X}$ controle negativo Antígeno = E/S	$\bar{X} \div \bar{X}$ controle negativo Antígeno = LCSA
WB7E3	1,20	0,87	1,01
WB3H4	1,48	0,87	0,95
WB6E2	0,72	0,67	1,32

Obs: Para cada antígeno foi obtido uma  $\bar{X}$  de controle positivo e uma para o controle negativo: WBS = 0,08/0,11; E/S = 0,08/0,09 e LCSA = 0,06/0,10

Os antígenos E/S utilizados no ELISA acima foram postos diretamente na placa sem prévia concentração de modo que as proteínas presentes estavam bastante diluídas.

Em um outro ELISA com leitura visual (estabelecendo valores de 0-4), testamos os 4 clones obtidos e constatamos que o WB 4H2 foi o que apresentou reação mais forte contra antígenos E/S, enquanto o WB 3H4 o que apresentou reação mais forte contra WBS.

Quanto a subclonagem, realizamos com os clones WB 3H4 e WB 7E3. Os seguintes subclones foram obtidos: WB 14 6B8; WB 14 1E2; WB 14 6C2 e 14 C6.

Em um experimento com o intuito de testar a reatividade de alguns dos clones anti *W. bancrofti* e anti *L. carinii*, contra antígenos E/S de cultivo de mfs. e contra soro humano de pacientes com filariose bancroftiana (SHI),

constatamos que: os soros de camundongos imunizados com antígenos somáticos de *W. bancrofti* reagem bem com antígenos E/S, SHI e fracamente com soro humano normal. E, quando os soros humanos imunes foram testados contra antígenos E/S os resultados foram superiores, indicando a presença de anticorpos contra proteínas E/S pelos parasitas nos soros daqueles indivíduos. Foi observado também um certo grau de reatividade do soro normal de camundongo contra os SHI.

#### 3.4.2 Contra Antígenos de *Litomosoides carinii*

A produção de AcMn anti ovos e embriões de *L. carinii* foi obtida após a terceira fusão :

Antígeno:  $10^5$  ovos e  $3 \times 10^5$  embriões de *L. carinii*

Dose: 3 doses com intervalos de 15 dias

Via: Intraperitoneal

Positividade do Soro em ELISA: +++ ( três vezes mais forte em relação ao controle negativo)

Porcentagem de Hibridomas em todas as Placas de Cultura: 37,94%

Porcentagem de Hibridomas Positivos para Antígenos de *L. carinii*: 28,62%

Porcentagem de Hibridomas Positivos e selecionados Para Clonagem: 8,2%

Os hibridomas mais positivos em ELISA foram expandidos e posteriormente clonados, sendo os seguintes clones anti antígenos de *L. carinii*: 3C11; 5B10; 4A11; 3G12

e 4C7.

Destes clones realizamos subclonagem e obtivemos o LC 5E12, LC 5A1 e LC 4F5 contra proteínas do parasita (seja LCSA, LCSO/E ou LCPPTA).

Alguns dos clones foram testados por ELISA para verificar reatividade com antígenos somáticos de **W. bancrofti** e contra soro humano imune de pacientes com filariose bancroftiana. Não houve detecção de antígenos, sendo os valores semelhantes ao controle negativo.

Os anticorpos produzidos por estes hibridomas não mostraram reação quando testados contra soro de rato não imune.

### **3.5 Imunofluorescência Indireta**

Os experimentos visando a determinação de sítios antigênicos específicos nas mfs. e realizados por imunofluorescência, revelou-nos que: os soros de camundongos imunizados com antígenos de **W. bancrofti** não mostraram reações fortes em relação aos controles negativos, ou seja, não houve fluorescência específica. O mesmo foi obtido com alguns dos anticorpos monoclonais anti **W. bancrofti**. No entanto quando utilizamos soro humano de pacientes infectados verificamos a fluorescência em pontos específicos das mfs. em contraste a não fluorescência do controle negativo (soro humano normal de área não endêmica). Estes resultados foram obtidos com mfs. íntegras postas em lâminas

no momento do teste, ou seja sem prévia fixação do antígeno. Em geral utilizamos mfs. recuperadas dos experimentos de cultivo **in vitro** para evitar a presença de proteínas do hospedeiro e reações falso positivas.

As Figuras 3.15 e 3.16 apresentam mfs. e larvas de **W. bancrofti** com fluorescência nas extremidades, obtidas com soro de camundongo anti WBI (mfs. íntegras).

Em todos os testes a reação foi mais intensa quando o anticorpo secundário era anti-IgG humana ou de camundongo (conforme a origem do anticorpo primário), que quando era anti-IgM.

Dentre os AcMn anti WB apenas o subclone 14 6B8 apresentou fluorescência em mfs. deste parasita.

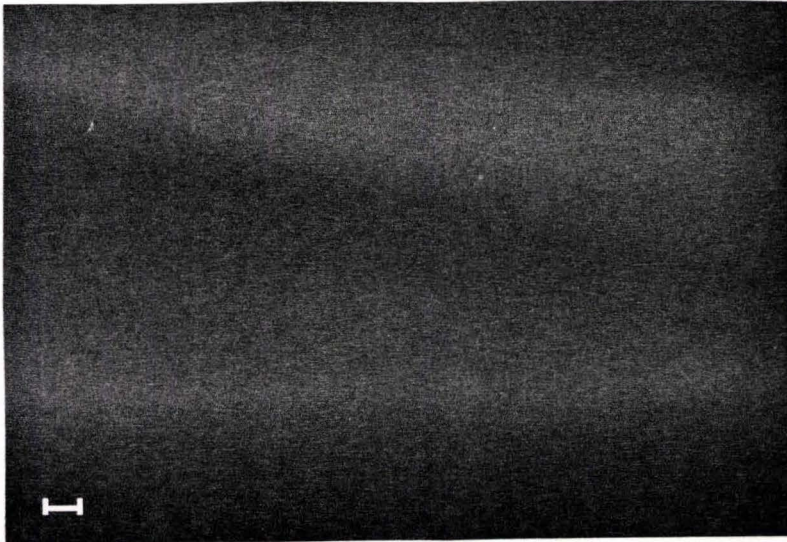


Figura 3.15 Imunofluorescência na extremidade anterior e posterior de microfilária de **Wuchereria bancrofti** com soro anti WBI.



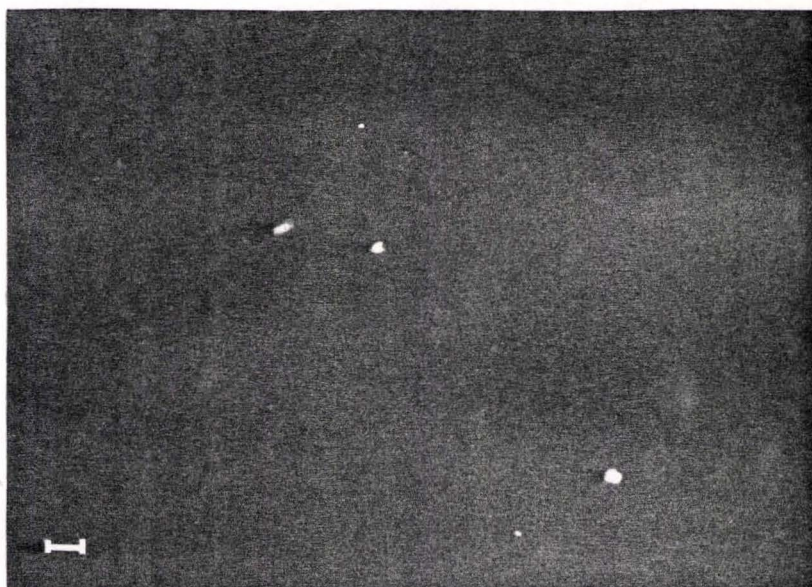


Figura 3.16 Imunofluorescência nas extremidades anteriores e posteriores de larvas de *Wuchereria bancrofti* com soro anti WBI.

Realizamos ainda o teste de imunofluorescência com ovos e embriões de *L. carinii*, havendo fluorescência específica a sítios localizados na superfície de ovos e nas extremidades e/ou superfície de embriões com soros anti LCO/E ou anti LCSA.



Figura 3.17 Imunofluorescência com ovo de *Litomosoides carinii* com soro anti LCO/E.

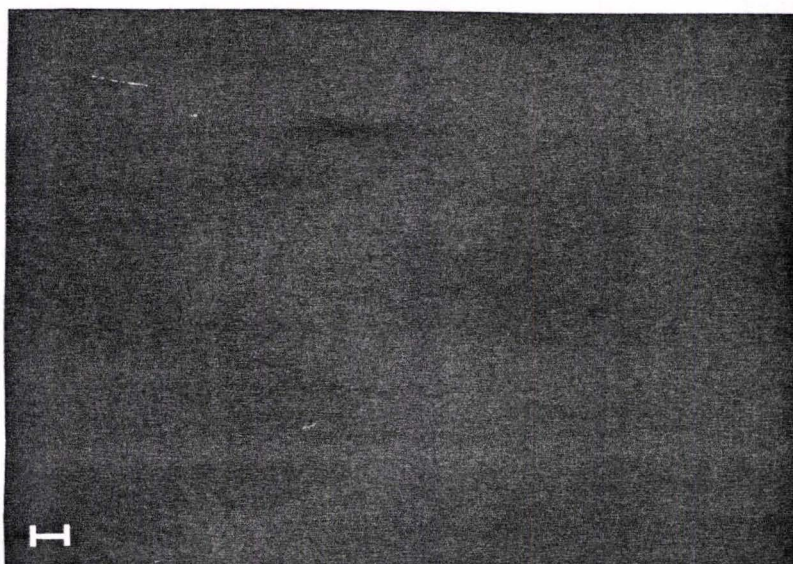


Figura 3.18 Imunofluorescência com embrião de *Litomosoides carinii* com soro anti LCSA.

### 3.6 Caracterização de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

#### 3.6.1 Com Antígenos de *Wuchereria bancrofti*

Antígenos solúveis de *W. bancrofti* foram postos a migrar em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Apesar das dificuldades encontradas com este antígeno (degradação de proteínas), foi possível obter alguns dados sobre este material antigênico.

Os resultados obtidos foram apenas com as amostras WBPPT (precipitado de extrato protéico). Detectamos bandas de Peso molecular (PM) entre 55-70 kDa, 40-45 kDa e entre 10-20 kDa (Figura 3.19).

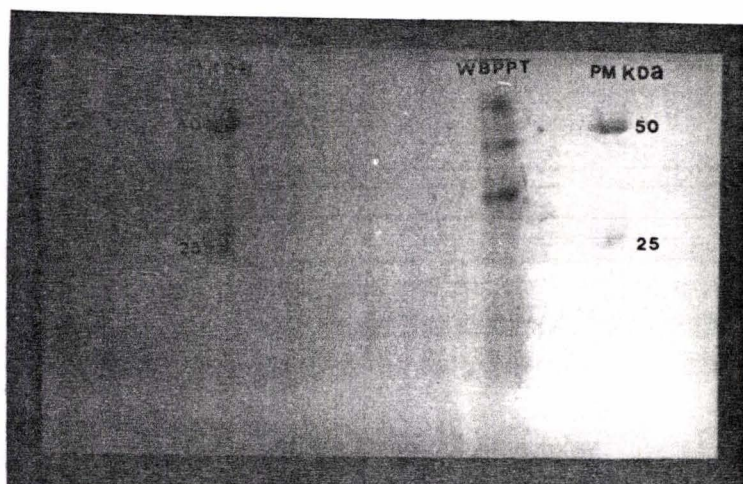


Figura 3.19 SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de *Wuchereria bancrofti* - WBPPT - precipitado de extrato protéico total de *W. bancrofti*; Padrões de Peso molecular estão indicados em kDa. Amostra WBPPT aplicada sob condições redutoras.

131

### 3.6.1.1 Marcados com I

Os resultados da marcação radioativa com o I (131) foram obtidos a partir de microfilárias íntegras, para marcação de proteínas de superfície - PS e de extrato protéico solúvel - WBT, para marcação de proteínas internas e de superfície - IS.

A radioatividade medida em cada amostra em um contador de cintilação de raios Gama forneceu-nos os dados:

		Volume	cpm
Amostra # 1	Sobrenadante	2,0 ml	127,974
	Precipitado	0,05 ml	61,689
Amostra # 2	Sobrenadante	0,05 ml	21,481
	Precipitado	0,05 ml	152,365

O volume dado corresponde apenas ao utilizado para a leitura. Obtivemos marcações principalmente com as

amostras de PS e leve marcação de bandas com as de IS (Figuras 3.20 e 3.21).

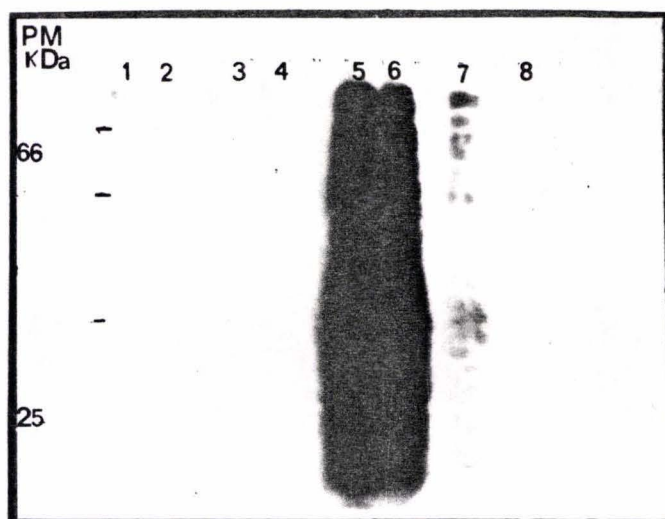


Figura 3.20 SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de *W. bancrofti* (radiodinadas) 1 & 2 Precipitado de PS; 3 & 4 - Sobrenadante de PS; 5 & 6 - Precipitado de IS (com excesso de iodo livre); 7 & 8 - Sobrenadante de IS. Amostras sob condições redutoras. As barras menores indicam as frações obtidas e as maiores indicam os padrões aproximados de peso molecular em kDa.

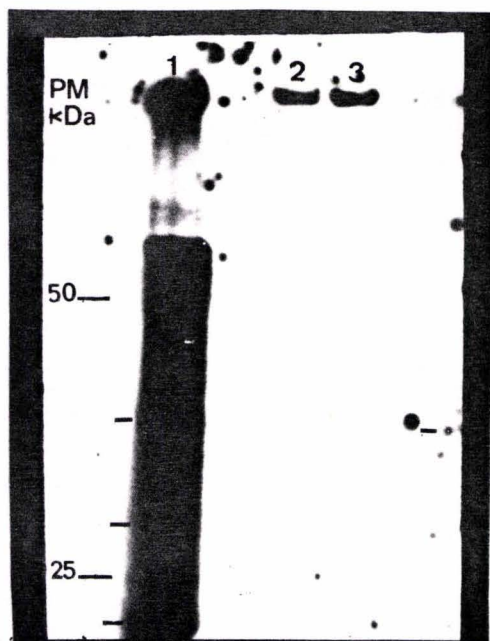


Figura 3.21 SDS - PAGE de proteínas de microfilárias de *W. bancrofti* (radiodinadas). 1-Precipitado de IS; 2 & 3-Sobrenadante de IS. As barras menores indicam as frações obtidas e as barras maiores os padrões aproximados de peso molecular.

### a) Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi realizada com os sobrenadantes de PS e IS com soros anti *W. bancrofti* e anti *L. carinii*. Os resultados indicaram a precipitação de duas bandas, uma de PM entre 50-80 kDa e outra entre 10-20 kDa com amostras de PS (Figura 3.22).

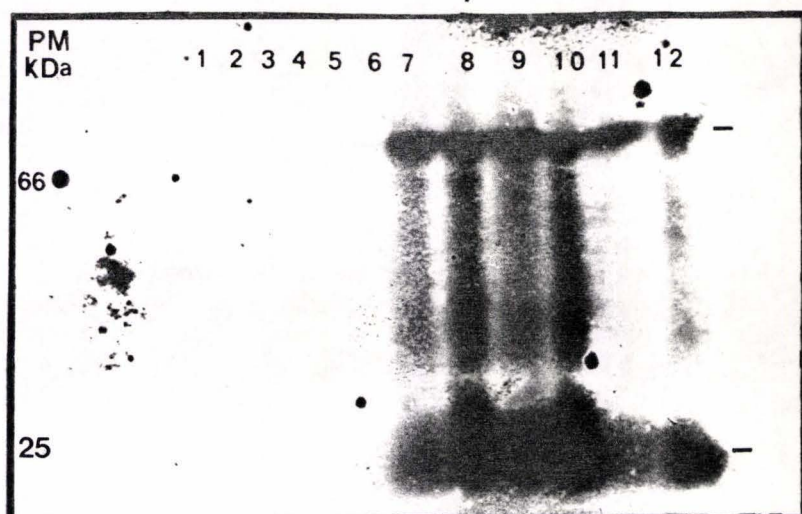


Figura 3.22 Imunoprecipitação de proteínas de microfírias de *Wuchereria bancrofti* (radiodinadas) com anti-soro anti WBI (7-10) e com soro anti LCSA (11-12). De 1-4 foi utilizado anticorpo monoclonal anti WBI e de 5-6 foi utilizado anticorpo monoclonal anti LC/OE. As barras indicam as frações obtidas. Os padrões aproximados de peso molecular estão indicados em kDa.

### 3.6.2 Com Antígenos de *Litomosoides carinii*

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE, foi realizada com diferentes preparações protéicas de *L. carinii*: sobrenadante de extrato protéico de ovos e embriões (LCSO/E) e precipitado de extrato protéico de

vermes adultos (LCPPTA).

Com o LCPPTA, três distintas bandas foram detectadas: uma de PM entre 66-80 kDa, outra entre 30-45 kDa e uma terceira entre 20-30 kDa. Outras bandas não definidas foram observadas, sendo estas situadas entre 43-80 kDa (Figura 3.23 A e B).

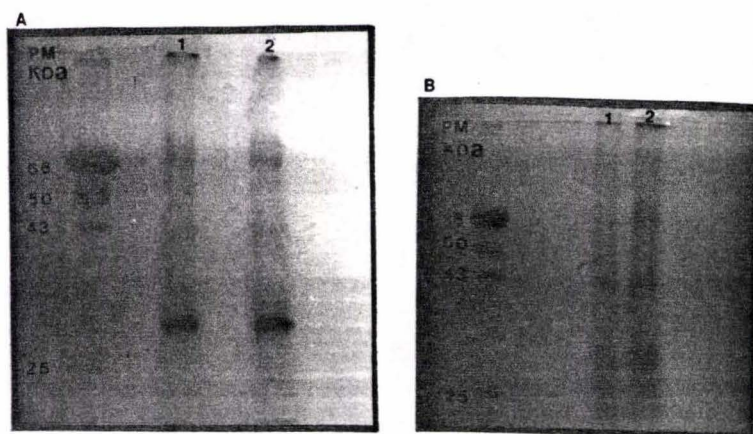


Figura 3.23 A & B - SDS-PAGE de precipitado de extrato protéico total de *Litomosoides carinii* (LCPPTA). A: 1 & 2 - Visualização de bandas entre 25-70 kDa; amostra sob condições não redutoras. B: 1 & 2 Mesma amostra de A sob condições redutoras, com uma banda adicional maior que 25 kDa. Os padrões de peso molecular estão indicados em kDa.

Com o LCSO/E, obtivemos duas bandas definidas, uma de PM entre 30-70 kDa e outra entre 20-30 kDa (Figura 3.24).

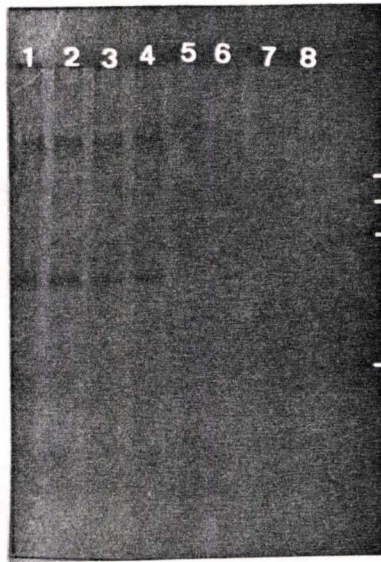


Figura 3.24 SDS - PAGE de proteínas de **Litomosoides carinii**. 1 a 4, extrato protéico solúvel de ovos e embriões (LCSO/E). 5 a 8 precipitado de extrato protéico de vermes adultos (LCPPTA). As barras brancas = aos padrões de peso molecular (de cima para baixo: 66, 50, 43 e 25 kDa). Amostras sob condições redutoras.

### 3.7 "Western Blotting"

A transferência de proteínas de **Wuchereria bancrofti** e **Litomosoides carinii** migradas em gel de poliacrilamida para o papel de nitrocelulose, revelou com os respectivos anti-soros a existência de frações não reveladas pelos métodos convencionais de coloração (Coomassie blue) e, no caso de **L. carinii** a marcação bem definida e forte de uma banda correspondente àquela observada em eletroforese simples e de PM entre 20-30 kDa (Figura 3.25).

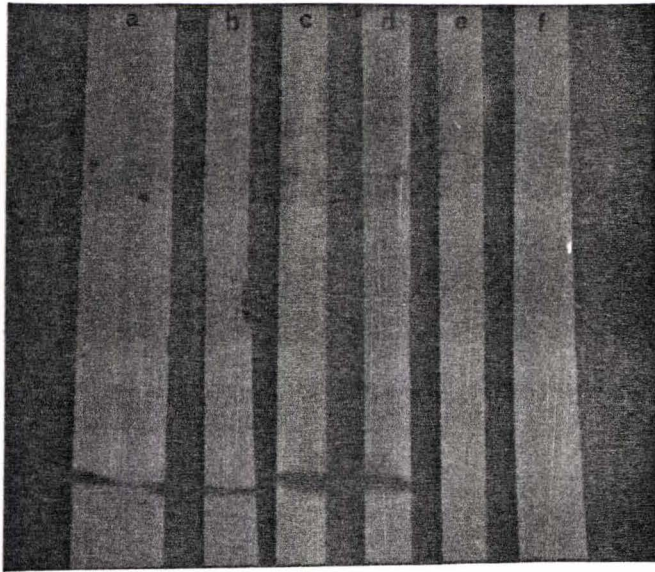


Figura 3.25 Western blotting com proteínas de microfilárias de *Wuchereria bancrofti*. f - extrato protéico solúvel de mfs. de *W. bancrofti* (WBPPT) com anti-soro WBI; e - WBPPT com anticorpo monoclonal anti WBI; d & c - sobrenadante de extrato protéico de vermes adultos de *L. carinii* (LCSA) com anti-soro anti LCSA; b & a - LCSA com anticorpo monoclonal anti LCSA. Os padrões de peso molecular estão indicados em kDa.



principais.

(a) Estudos básicos visando ao conhecimento genético dos parasitas e sua relação evolutiva, bem como a definição de antígenos estágio específicos em estudos ontogenéticos. Nesta área cabe ainda salientar a investigação da relação parasita-hospedeiro, e os mecanismos de desenvolvimento da patologia;

(b) Desenvolvimento ou aperfeiçoamento de métodos imunodiagnósticos.

Os antígenos filáricos utilizados no presente estudo foram principalmente microfilárias (mfs.) íntegras, isoladas do sangue e o extrato protéico desses vermes e, mais posteriormente, antígenos excretados e/ou secretados (E/S) durante o cultivo *in vitro* de mfs. de *W. bancrofti*. O método empregado para o isolamento das microfilárias do sangue de indivíduos infectados, através de filtrações, foi mais eficaz que o usado nas primeiras tentativas de isolamento por gradiente de densidade (Ficoll-hypaque  $d = 1,07$ , dados não descritos). A quantidade total de mfs. recuperadas com o método de filtração foi superior ao primeiro, levando em consideração amostras de sangue com o mesmo volume e média de parasitas /ml.

A composição protéica de mfs. de *W. bancrofti* e de *L. carinii* foi analisada neste trabalho empregando-se vários tipos de técnicas analíticas. Conforme salientado anteriormente, a maior parte delas envolveu a utilização de

anticorpos monoclonais (AcMn) ou anti-soros produzidos em camundongos, razão pela qual estas proteínas são referidas como "antígenos filáricos".

#### **Imunizações e produção de anti-soros**

Na obtenção do extrato protéico de *W. bancrofti*, as amostras apresentaram uma baixa quantidade de proteínas solúveis. Este problema ocorre de modo geral sempre que se objetiva a caracterização de proteínas de filarídeos, sendo necessária nestes casos a marcação das mesmas com isótopos radioativos como podemos constatar com os trabalhos de Philipp e cols. (1984), Maizels e cols. (1984) e outros. A degradação de proteínas, em algumas amostras, ocorreu mesmo em presença de inibidores de proteases e níveis baixos de temperatura.

É possível que as frações estivessem subdivididas de tal forma que diferentes anticorpos tenham sido produzidos contra as mesmas e complexados aos antígenos formando complexo imune circulante (CIC).

Se por um lado o CIC pode contribuir para o baixo título de anticorpos circulantes no soro imune, por outro lado, o isolamento e caracterização deste complexo é útil para a identificação dos principais antígenos envolvidos e entendimento dos mecanismos patogênicos da filariose. CIC tem sido obtido e analisado em soros de pacientes microfilarêmicos e amicrofilarêmicos, sendo um indicador direto de produtos dos parasitas no corpo do hospedeiro e

útil na distinção entre uma infecção passada e uma infecção recente (Franks, 1946; Gajanana e cols., 1982; Paranjape e cols, 1986).

Quanto às imunizações, a quantidade de material antigênico foi bastante elevada. Carlow e cols. (1987) analisaram este fato e forneceram um protocolo de imunizações de camundongos, onde foi realizada a fusão com camundongos imunizados três dias antes com uma única dose de 500 larvas infectantes vivas de *Brugia malayi* ou *Onchocerca cervicalis*, por infecção intraesplênica. O presente estudo foi realizado com microfilárias de *W. bancrofti*, portanto não podemos avaliar se os resultados teriam sido diferentes no que se refere à produção de anticorpos em camundongos.

As mfs. íntegras, utilizadas na imunização de camundongos, eliciaram resposta imune bastante favorável considerando a positividade detectada em ELISA na detecção de antígeno filárico. Com o extrato solúvel foi necessário um maior número de inoculações do antígeno para que obtivéssemos um soro com alto título de anticorpos. Isto pode ter sido devido a frações protéicas não suficientemente imunogênicas, obtidas após desintegração por ultra som e extração de proteínas por detergente. No entanto, com o soro obtido após a 3ª imunização com qualquer das preparações antigênicas, os resultados do ELISA foram melhores quando o soro era contra WBS ou WBT.

Quanto à produção de anti-soros anti *L. carinii*,

verificamos que todas as preparações antigênicas deste parasita mostraram-se bastante imunogênicas, já que a produção de anticorpos foi obtida após a primeira injeção intraperitoneal com proteínas extraídas de vermes adultos ou com ovos/embriões íntegros do parasita. Entre os dois tipos de preparações antigênicas, constatamos que a reatividade cruzada é forte, pois a intensidade de resposta (ELISA) é igual quando o soro é testado contra o material utilizado como imunógeno, como quando é testado contra o segundo tipo (extrato de vermes adultos ou ovos/embriões).

Quanto à imunização de camundongos com ovos e embriões, verificamos uma resposta dependente da dose, que aumentou após duas ou três imunizações, bem como uma resposta maior induzida por um número mais elevado de ovos e embriões (conforme já observamos na Tabela 3.2). Além do mais, as imunizações por via endovenosa eliciaram resposta imune mais favorável que as por via intraperitoneal (IP), indicando uma "tolerância" maior ao antígeno quando recebido pela 2ª via de imunização (IP).

#### **Caracterização de antígenos filáricos por ELISA**

O teste ELISA tem sido bastante utilizado em inúmeros trabalhos com antígenos somáticos de *W. bancrofti* para a detecção de anticorpos anti-filáricos, devido à fácil disponibilidade de reagentes necessários, baixo custo econômico e reprodutibilidade.

Algumas enzimas como a fosfatase alcalina,

peroxidase ou penicilinase, são usadas no conjugado (anticorpo secundário anti imunoglobulina de camundongo ou humana + enzima) em ELISA. Algumas falsas reações positivas têm sido associadas a ligações não específicas do conjugado com proteínas do hospedeiro (Bartlett e cols., 1975).

Kaliraj e cols. (1981a) utilizaram a enzima penicilinase em um teste para a demonstração de anticorpos em indivíduos com filariose bancroftiana. Esta enzima mostrou-se mais sensível que as outras quando a fonte antigênica era o sangue de indivíduos parasitados (antígenos circulantes), não havendo reações inespecíficas.

O ELISA mostrou-se um teste extremamente útil em nosso sistema experimental, principalmente graças à sua rapidez, baixo custo e alta sensibilidade. Conforme descrito anteriormente, anti-soros ou anticorpos monoclonais produzidos contra vários tipos de preparações antigênicas forneceram resultados positivos com este teste.

Através de ELISA, foi detectada uma reação positiva de soros anti *W. bancrofti* com soro humano normal (não imune). Este resultado indica a presença de proteínas do hospedeiro aderidas à cutícula das microfilárias.

Os resultados dos soros imunes anti *L. carinii* contra soro de rato não infectado (hospedeiro definitivo) sugerem que o parasita não apresenta proteínas do hospedeiro

aderidas à cutícula, ou que estas não estão em quantidade suficiente para a sua detecção pelos métodos mais comumente utilizados. No entanto, Philipp e cols. (1984) através de marcação radioativa detectaram na superfície do parasita *L. carinii*, em diferentes fases do ciclo de vida, um componente de peso molecular (PM) = 55 kDa que era albumina do soro do hospedeiro. É possível que a aderência de proteínas do soro do hospedeiro nos parasitas, seja dependente do grau de infestação ou do estágio de vida do parasita. Outra alternativa é que esta aderência seja dependente do hospedeiro, já que para *L. carinii* é possível a existência de mais de um hospedeiro definitivo (Williams, 1948; Court e Storey, 1981).

Quanto aos dados em ELISA, com as nossas amostras de soros de indivíduos com sintomas de filariose bancroftiana, estes apresentaram reação mais forte contra proteínas somáticas de vermes adultos de *L. carinii* do que contra proteínas somáticas ou excretadas e/ou secretadas de *W. bancrofti*. Existe reatividade cruzada entre os dois parasitas (discutida adiante), mas o por que de a reação dos soros humanos ter sido mais forte com antígenos de *L. carinii* não é possível determinar apenas com os nossos dados.

A ausência de resposta a antígenos filáricos em infecções crônicas tem sido estudada sem entretanto haver

definição dos mecanismos envolvidos e conseqüências no hospedeiro. Ottesen e cols. (1977) citam três aspectos para o entendimento do controle genético da resposta imune em filariose e outras infecções helmínticas crônicas: o grau de imunidade protetora à reinfecção desenvolvida por um hospedeiro parasitado; a contribuição da resposta imune ao desenvolvimento da patologia característica da doença; e a incapacidade do hospedeiro em eliminar o agente invasor.

Quanto aos testes utilizados para verificar reação com anti-soros de camundongos imunizados com homogenados de vermes adultos de *L. carinii*, observamos reação positiva, apesar da pouca intensidade. Estudos semelhantes indicaram que, além da reatividade cruzada entre as filárias humanas e de roedores, o hospedeiro pode conter antígeno solúvel na circulação durante o curso da infecção (Dasgupta e Bala, 1978).

A reação mais forte dos soros humanos imunes contra antígenos de *L. carinii* do que contra antígenos de *W. bancrofti*, pode ter entre outras, as seguintes explicações.

(a) A exposição constante aos antígenos filáricos pode estar levando à tolerância ou não sensibilidade a antígenos específicos de *W. bancrofti*;

(b) O reconhecimento inespecífico de antígenos comuns a todos os nematódeos, que estariam em maior proporção nos vermes adultos de *L. carinii* que nas

microfilárias de *W. bancrofti*.

Estudos adicionais precisam ser realizados com outras preparações antigênicas de ambos os parasitas bem como utilização de outras amostras de soros de pacientes com diferentes formas clínicas da doença para obtermos mais dados sobre a resposta imune eliciada pelos parasitas.

No que se refere ao uso de antígenos liberados *in vivo*, a presença destes, nos soros humanos de pacientes com diferentes formas clínicas de filariose bancroftiana, foi verificada com o uso de soros imunes de camundongos ou anticorpos monoclonais. Os soros murinos anti WBI e anti WBS foram praticamente iguais em intensidade na detecção de antígenos circulantes.

Além de antígenos somáticos, utilizamos em ELISA antígenos excretados e/ou secretados (E/S), obtidos do cultivo *in vitro* de mfs. de *W. bancrofti*.

Em termos de imunodiagnóstico, o nível de antígenos de uma infecção filárica é mais informativo que o nível de anticorpos (Harinath, 1984), pois numa área endêmica torna-se difícil distinguir pelo título de anticorpos se se trata de infecção recente ou de exposição anterior ao antígeno. Proteínas E/S, consideradas mais específicas e úteis que antígenos somáticos (Kharat e cols., 1981), têm sido bastante empregadas mais recentemente.

No que se refere à caracterização protéica, esta é



útil na identificação de frações antigênicas comuns ou não a outros parasitas, verificando-se a existência de similaridade genética, bem como na detecção de antígenos espécie-específicos ou estágio-específicos em estudos ontogenéticos.

Antígenos E/S são obtidos mais facilmente que os somáticos e, com o uso de técnicas adequadas, podem ser obtidos livres de proteínas do hospedeiro.

As necessidades nutricionais exigidas pelas mfs. durante o cultivo *in vitro* dificultam um pouco a obtenção pura dos antígenos E/S. No entanto é possível que estudos adicionais em cultivo *in vitro* de mfs. encontrem alternativas para a sua manutenção com níveis mínimos de soro fetal bovino ou humano.

Vários estudos têm confirmado a importância de antígenos E/S em infecções filáricas, sendo analisadas principalmente por ELISA (Kharat e cols., 1982; Malhotra e Harinath, 1984a), imunofluorescência (Kharat e cols., 1983), ensaio imunoradiométrico (Forsyth e cols., 1985; Hamilton e cols., 1984) e anticorpos monoclonais (Reddy e cols., 1984b).

Os antígenos E/S que obtivemos foram processados (centrifugação, concentração) para eliminar partículas indesejáveis. Nossos estudos, entretanto, indicaram a necessidade de um processamento mais refinado desses antígenos, como por exemplo a filtração de proteínas em gel (Sephadex) e fracionamento em coluna de cromatografia

(celulose), como tem sido feito por outros pesquisadores (Malhoira e Harinath, 1984b).

De qualquer forma acreditamos, pelos resultados obtidos em ELISA, que antígenos E/S detectados por diferentes soros anti *W. bancrofti* ou com AcMn são uma boa fonte antigênica. Outro ponto a favor é a menor probabilidade de que haja proteínas do hospedeiro no meio, um problema que ocorre com frequência quando se utiliza antígenos somáticos (Philipp e cols., 1984; Maizels e cols., 1984).

Estes resultados obtidos com antígenos E/S são semelhantes aos encontrados em outros estudos com *W. bancrofti* e outros filarídeos por diversos pesquisadores (Kaushal e cols., 1984; Harinath, 1986). Kharat e cols. (1982) por exemplo, verificaram que o emprego destes antígenos E/S em ELISA mostrou-se altamente sensível (sendo suficiente 0,35 ng de antígeno/100 ul de solução) na detecção de anticorpo anti-filárico.

#### **Caracterização de antígenos filáricos por SDS-PAGE**

Os estudos para a caracterização de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS, realizados com o extrato protéico solúvel de mfs. de *W. bancrofti* e o precipitado deste extrato, revelaram um número de bandas menor do que se esperaria obter com tal preparação antigênica. Não foi possível obter um padrão de bandas utilizando o sobrenadante do extrato protéico solúvel (WBS). Com o

precipitado do extrato protéico solúvel (WBPPT) detectamos três distintas bandas sob condições redutoras (55-70 kDa; 40-45 kDa e 10-20 kDa).

O pequeno número de bandas obtidas em gel pode ter sido devido, entre outras razões, à presença de enzimas proteolíticas ou à liberação de inúmeras frações protéicas em baixa concentração. Estes pontos, aliados certamente à dificuldade de obtenção de antígenos deste parasita, podem explicar a pouca disponibilidade de dados referentes à caracterização de proteínas de *W. bancrofti*.

Neste estudo levamos em consideração a necessidade de obtenção de um padrão protéico com as diferentes preparações do parasita, tendo em vista que a caracterização de antígenos filáricos é de suma importância na determinação de antígenos espécie e estágio-específicos. No presente caso, nosso objetivo foi determinar antígenos específicos à forma embrionária, a microfilária. Nossos trabalhos, embora insistentes, não forneceram dados mais detalhados devido principalmente aos já citados problemas com as preparações antigênicas que, embora tenham se revelado bastante imunogênicas quando da imunização de camundongos, não foram facilmente detectadas em técnicas convencionais de fracionamento protéico (eletroforese em gel de poliacrilamida).

### **Caracterização de antígenos filáricos por "Western blotting"**

Mesmo com baixa detecção de proteínas em gel de poliacrilamida, foi realizada a transferência destas para o papel de nitrocelulose-NC ("Western blotting") para posterior reação com soros policlonais e AcMn.

Os resultados foram bastante favoráveis com relação ao reconhecimento dos anti-soros e AcMn tanto para *W. bancrofti* quanto para *L. carinii*. Com antígenos de *W. bancrofti* houve o reconhecimento pelos anti-soros de algumas frações protéicas levemente marcadas após revelação. Com os AcMn anti *W. bancrofti* não houve nenhuma marcação nítida de frações.

Quanto aos dados de "Western blotting" de *L. carinii*, os soros policlonais evidenciaram bandas nitidamente marcadas após revelação. Os AcMn contra este parasita reagiram fortemente com uma banda de peso molecular entre 20 e 30 kDa, banda também evidenciada com os soros policlonais e que corresponde à observada por eletroforese simples em gel de poliacrilamida.

### **Caracterização de antígenos filáricos por marcação radioativa**

Com referência aos dados de marcação radioativa de mfs. de *W. bancrofti* (proteínas internas e de superfície), obtivemos um padrão de bandas semelhante ao obtido com o precipitado de extrato protéico solúvel-WBPPT

por SDS-PAGE. A vantagem da utilização desta técnica foi a detecção mais definida de frações protéicas e com menores quantidades de material antigênico utilizado.

Na realidade, poucos dados são disponíveis de fracionamento protéico com marcação radioativa, principalmente com *W. bancrofti*. Entre os trabalhos mais relevantes temos o de Maizels e cols. (1984) sobre componentes de superfície de mfs. de *W. bancrofti*, demonstrando que o principal componente na superfície das mfs. era albumina de soro humano. Dados semelhantes foram obtidos por Philipp e cols. (1984) com *L. carinii*.

Muitos outros estudos têm sido realizados sobre a organização molecular de nematódeos com técnicas de marcação radioativa, para definir componentes a partir de quantidades limitadas de material dos parasitas. Em alguns destes trabalhos os autores têm-se deparado com algumas questões importantes no que concerne à natureza dos antígenos obtidos e à dependência da detecção dos mesmos com a técnica empregada (Sutanto e cols., 1985; Taylor e cols., 1986).

#### **Caracterização de antígenos filáricos por imunofluorescência**

Com relação aos dados obtidos com testes de imunofluorescência, verificamos a detecção de sítios antigênicos com soros imunes (camundongos ou humanos) nas mfs. e larvas de *W. bancrofti*. Estes sítios localizaram-se nas extremidades anteriores e /ou posteriores respectivamente. Nos ovos e embriões de

*L. carinii*, os sítios revelaram-se como pontos antigênicos bem definidos ao longo da superfície dos mesmos.

A leve reação observada com soro humano normal em alguns dos testes, pode ter sido devida à adsorção inespecífica do conjugado (anticorpo secundário), à superfície do parasita, provocando fluorescência inespecífica.

De acordo com Kaliraj e cols. (1979), reações falso-positivas encontradas com o uso de soro humano normal podem ser explicadas pela existência de anticorpos, originados do hospedeiro, aderidos à bainha dos parasitas.

No presente estudo as reações inespecíficas foram observadas com soro humano normal de área não endêmica e apenas quando utilizamos mfs. não cultivadas *in vitro*.

Muitos estudos foram realizados sobre reações de imunofluorescência envolvendo bainha, cutícula e citoplasma de mfs. íntegras ou fragmentadas (Gonzaga dos Santos e cols., 1976; Riddley e Hedge, 1977; Kaliraj e cols., 1979) e, mais recentemente, com antígenos E/S (Kharat e cols., 1983). Embora os estudos acima confirmem que os anticorpos envolvidos nestas reações não são letais ao parasita, os mecanismos ligados à fluorescência são importantes no que se refere a sobrevivência das microfilárias.

Um outro ponto que consideramos importante foi a realização dos testes sem fixação prévia do antígeno em lâmina, pois quando assim o fazíamos, havia muitas reações

inespecíficas de fluorescência, obtidas mesmo quando tratávamos previamente o antígeno com enzima proteolítica. Isto é recomendado por outros pesquisadores, para expor uma área antigênica maior para reação com anticorpos específicos que a obtida com o uso de mfs. fragmentadas (Gonzaga dos Santos e cols., 1976). Todas as etapas do teste foram então, realizadas em fase líquida, com mfs. íntegras geralmente obtidas de cultivo *in vitro*. Os resultados foram consideravelmente melhores com relação à especificidade dos anti-soros e eliminação de reações inespecíficas.

Quanto ao conjugado (anticorpo secundário) empregado nas reações, verificamos que o anti-IgG (de camundongo ou humano) foi o que reagiu mais intensamente com os anti-soros empregados, comparados com o anti-IgM. Na verdade a presença destas duas classes de imunoglobulina em soros imunes de pacientes com filariose, já foi verificada por Kharat e cols. (1983).

De modo geral, nossos dados não diferem quanto à localização de sítios antigênicos nos parasitas, detectados pelos anti-soros empregados em relação aos obtidos por outros pesquisadores.

#### **Produção de anticorpos monoclonais - AcMn**

Quanto à produção de AcMn contra antígenos de *W. bancrofti*, obtivemos diversos clones secretando anticorpos contra diferentes antígenos deste parasita, verificados através de ELISA.

Poucos trabalhos têm sido descritos a respeito de AcMn contra *W. bancrofti*. Entre os mais recentes podemos citar o de Reddy e cols. (1984b), que produziram AcMn contra antígenos E/S de *W. bancrofti* durante cultivo *in vitro* de microfilárias e o de Weil e cols. (1987) que produziram um anticorpo monoclonal que detectou antígeno circulante em pacientes com filariose bancroftiana. Os estudos nesta área têm sido limitados pela dificuldade de obtenção de proteínas de *W. bancrofti* em grande quantidade. Assim, muitos trabalhos têm sido realizados com antígenos de parasitas relacionados, para a obtenção de reagentes úteis em filariose humana e animal (Des Moutis e cols., 1983; Aggarwal e cols., 1985; Forsyth e cols., 1985).

Quanto aos AcMn anti *L. carinii*, obtivemos bons resultados em ELISA e "Western blotting". Os resultados em ELISA foram bons quando utilizamos quaisquer das preparações antigênicas deste parasita.

Apesar da disponibilidade de material de *L. carinii* (ovos/embriões e vermes adultos), nenhum trabalho relevante foi descrito sobre produção de AcMn contra este parasita. Nossos dados indicam que a obtenção de AcMn contra antígenos de *L. carinii* é de importância não só para o estudo de filariose animal como de filariose humana, mais estritamente, a bancroftiana.

Quanto ao uso de antígenos circulantes, a reatividade dos soros imunes (policlonais) de camundongos



foi mais intensa que a dos soros humanos imunes. A fraca reatividade dos AcMn é possivelmente devida à sua especificidade contra proteínas ausentes nos soros de pacientes aqui empregados.

Os AcMn apresentaram reação positiva em ELISA, contra proteínas E/S *in vitro*. Embora a intensidade da reação não tenha sido tão forte quanto a obtida com antígenos somáticos, nossos resultados não diferem significativamente daqueles obtidos por Reddy e cols. (1984b).

Entre os AcMn testados, apenas o subclone 14 6B8 mostrou reação fluorescente com mfs., indicando que, após subclonagem, obtivemos um anticorpo monoclonal dirigido a sítios antigênicos nas extremidades de mfs. de *W. bancrofti*.

#### **Reatividade cruzada entre proteínas de *W. bancrofti* e *L. carinii***

Quando existe similaridade genética entre parasitas, relacionados proximamente (da mesma família ou gênero) ou mais distantemente (da mesma ordem ou classe) há a possibilidade de utilização dos antígenos de uma outra espécie (heteroantígenos) para a verificação de reatividade cruzada e posterior utilização como antígeno alternativo. Em filariose, o uso de heteroantígenos é muito comum, tendo em vista a falta de antígenos parasitários específicos em quantidade suficiente para as diversas finalidades.

Um estudo com heteroantígenos foi realizado por Dissanayake e Ismail (1980b) e mostrou que quando uma fração antigênica de *Setaria digitata* (que apresentava a mais alta reatividade com antígenos de *W. bancrofti*) era usada em ELISA, apenas baixos níveis de anticorpos eram detectados em soros de indivíduos que não tinham evidências de infecção com *W. bancrofti*. Utilizando soro imune de gado infectado com *S. digitata*, concluíram que este soro poderia ser usado para bloquear reatividade cruzada com anticorpos do soro de indivíduos que não apresentavam evidências de infecção com *W. bancrofti*.

O estudo acima evidencia um aspecto bastante favorável do uso de heteroantígenos. Por outro lado, é preciso que estes antígenos sejam de espécies as mais proximamente relacionadas, pois problemas tais como falsas reações positivas ou negativas são frequentes (Ambroise-Thomas, 1974).

No presente estudo, utilizamos antígenos de *Litomosoides carinii*, verme parasita de ratos silvestres, que tem sido uma das espécies de filarídeos mais utilizadas como heteroantígeno em estudos de filariose, devido a disponibilidade de antígenos (de vermes adultos ou formas embrionárias).

Os experimentos com *L. carinii*, tiveram como objetivo principal a verificação da existência de reatividade cruzada com antígenos de *W. bancrofti*. Constatamos que o nível de anticorpos contra antígenos de

*W. bancrofti* com o soro anti *L. carinii*, medido por densidade óptica após ELISA, foi de intensidade maior que quando usamos o soro imune anti *W. bancrofti* contra antígenos de *L. carinii*. Estes resultados confirmam nossa idéia inicial da existência de reatividade cruzada entre estes dois nematódeos. Este é mais um indicio da proximidade genética existente entre eles (Culbertson e cols, 1944; Dasgupta e Bala, 1978; Storey e Mettias, 1980).

Com relação à imunoprecipitação de antígenos de superfície de *W. bancrofti*, com anti-soro contra o parasita e contra *L. carinii*, as bandas obtidas demonstraram que ambos os anti-soros reconhecem e precipitam frações protéicas comuns aos dois parasitas. Não podemos entretanto, deixar de considerar que utilizamos neste experimento soros policlonais, que podem apresentar inúmeros anticorpos contra diferentes antígenos com diferentes determinantes antigênicos.

A reatividade dos soros anti *L. carinii* indica o existência de homologia entre estes dois parasitas. Um extenso estudo sobre precipitação de antígenos foi realizado por Lobos e Weiss (1986), sendo observado que os soros de pacientes infectados com *W. bancrofti* continham anticorpos contra 85 antígenos de *Onchocerca volvulus*, evidenciando assim a semelhança entre os dois filarídeos.

Os resultados obtidos com testes de imunofluorescência entretanto mostraram que a maioria dos

anti-soros empregados não apresentou reação cruzada entre *W. bancrofti* e *L. carinii*, demonstrando a preferência do teste por antígeno homólogo. Isto indica que as proteínas compartilhadas pelos dois filarídeos e detectadas por ELISA e imunoprecipitação têm localização preferencialmente interna, sendo as proteínas de superfície mais específicas. Tal situação é possivelmente explicada pelo fato de que estes dois filarídeos interagem com hospedeiros diferentes, e as proteínas expressas na superfície têm um papel fundamental nesta interação. Desta maneira, pode-se supor que ao longo do processo evolutivo tenha-se mantido uma semelhança genética entre estes filarídeos ao nível das proteínas somáticas, sendo entretanto exigida uma adaptação a diferentes ambientes, e portanto uma divergência, a nível das proteínas de superfície.

Todos os estudos aqui realizados seja com *W. bancrofti* ou *L. carinii*, estão estreitamente ligados quanto aos resultados obtidos. Estes dados, apesar de preliminares, contribuem para a avaliação da proximidade genética dos parasitas e para a elucidação dos mecanismos imunogenéticos desencadeados no organismo parasitado.

#### 4.2 Cultivo *in vitro* de Microfilárias de *Wuchereria bancrofti* - Viabilidade e Diferenciação

O cultivo *in vitro* de mfs. de *W. bancrofti* e outros parasitas relacionados têm recebido a atenção de muitos pesquisadores. Este método constitui-se em uma das alternativas para o estudo do processo de diferenciação de um organismo, sob condições ambientais semelhantes às observadas *in vivo*, bem como para a análise da capacidade de sobrevivência destes parasitas a variações de nutrientes, temperatura, pressão etc.

No presente estudo, o cultivo *in vitro* de mfs. de *W. bancrofti* permitiu acompanhar o processo de diferenciação deste parasita quando submetido a diferentes condições de manutenção. O objetivo principal foi investigar os agentes indutores do processo de diferenciação dos embriões. Outros aspectos também analisados foram: manutenção da viabilidade sob diferentes condições, efeito de soro imune sobre a viabilidade das microfilárias e indução de aderência de células de exudato peritoneal murino (CEP) aos parasitas.

Nos primeiros experimentos verificamos a viabilidade das mfs. em três diferentes meios de cultivo. Os resultados indicaram que os parasitas são muito resistentes ao cultivo *in vitro*, sendo observado em um dos experimentos viabilidade próxima a 100% até o 21<sup>o</sup> dia de cultivo. Algumas condições entretanto mostraram-se incapazes de manter as mfs. vivas além de um período de 24 h.

Dos três meios empregados MEM, RPMI 1640 e 199 (A, B e C respectivamente), o primeiro foi o único em que as mfs. só se mantiveram viáveis por 4 dias com ou sem complementação de soro e/ou aminoácidos, açúcares e sais orgânicos do meio de Grace para insetos (aao).

Apesar de sua composição simples, o meio A tem sido empregado com sucesso no cultivo de filarídeos. Ando e cols, (1980a) obtiveram viabilidade próxima a 100 % com mfs. de *Dirofilaria immitis* durante 16 dias neste meio a 27°C ou a 36°C e resultados semelhantes são descritos por Ando e Kitamura (1982). A ineficácia deste meio em manter as mfs. de *W. bancrofti*, pode advir de diferenças básicas no metabolismo destes dois filarídeos.

Quanto aos meios B e C, mostraram-se similares na manutenção da viabilidade das mfs., sendo a complementação com soro bovino ou humano necessária para tal, já que em sua ausência as mfs. morrem em poucos dias. Resultados semelhantes foram obtidos por Ripoll (1985) onde sobrevivência de mfs. em meio RPMI 1640 sem soro, foi de 3, 4, 5 e 7 dias respectivamente para *W. bancrofti*, *Dipetalonema perstans*, *Dirofilaria immitis* e *Loa loa*. Outro fator utilizado nestes experimentos foi uma concentração maior de CO<sub>2</sub> (10%) em contraste com a utilizada no presente trabalho que foi de 5%. Resumindo, a adição de soro é fundamental para a viabilidade das mfs., bem como a presença de CO<sub>2</sub>.

Observamos também que o soro pode ser substituído por células "alimentadoras", sob a forma de uma camada de CEP. Estas CEP possivelmente liberam fatores de crescimento ou outros metabolitos que contribuem para a sobrevivência dos parasitas. Estudos adicionais visando a purificação, identificação e utilização destes fatores de crescimento serão de valiosa importância na adequação de meios de cultivo mais favoráveis à manutenção destes parasitas.

Outro fator a considerar é que os soros ou as células possam contribuir para a otimização da tonicidade ou pressão osmótica do meio de cultivo, fornecendo assim melhores condições ambientais à microfilárias.

Associado aos meios B e C, e complementação destes com soro ou aao, a manutenção das placas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar foi necessária para que as mfs. mantivessem viabilidade próxima a 100% e motilidade máxima durante períodos superiores a 20 dias. Estes resultados concordam com estudos efetuados por Ando e cols. (1980a) com *D. immitis*, enquanto Kharat e cols. (1980) observaram apenas 20% de mfs. de *W. bancrofti* viáveis no 20<sup>o</sup> dia de cultivo em condições semelhantes às nossas. Estas condições são na realidade semelhantes às encontradas pelas mfs. no hospedeiro definitivo, principalmente quanto à tonicidade do meio, presença de nutrientes e temperatura. Mantidas estas condições os embriões permanecem viáveis durante períodos de tempo relativamente longos.

O pH dos meios de cultivo, entre 7,3 e 7,4 quando de sua preparação, mostrou-se outro fator fundamental para a manutenção da viabilidade das mfs.. No primeiro experimento, o meio foi acrescido de HEPES e as placas mantidas em caixas contendo 5% de CO<sub>2</sub> e incubadas a 37°C em estufa comum. Nestas condições o pH do meio não se manteve dentro da faixa 7,3-7,4, sofrendo alcalinização. Quando comparamos este experimento com outros posteriormente realizados, nos quais as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> automática, observamos que nestes a viabilidade das mfs. tornou-se bem maior. Por outro lado, nos cultivos a 28°C ou a 37°C sem CO<sub>2</sub>, a presença ou ausência de HEPES no meio determinou a manutenção ou não da viabilidade das mfs.. A melhor faixa de pH dos meios de cultivo, utilizada por outros pesquisadores, foi semelhante, 7,2 a 7,6 para *D. immitis* e *Dipetalonema perstans* (Ripoll, 1985). Esta última autora encontrou que para *Loa loa* o pH mais propício do meio de cultivo é diferente, sendo igual a 8,0.

No que se refere aos estudos sobre diferenciação, não existe ainda um quadro claro de como ocorre e quais os fatores intrínsecos e extrínsecos responsáveis pelo processo.

Entre os nematódeos, que são formados de um número relativamente grande de células, e que estão classificados em um pequeno número de tipos celulares, o modelo para estudo do processo de desenvolvimento celular é o



**Caenorhabditis elegans.** Este é anatômica e geneticamente simples e tem fornecido dados importantes sobre os estudos em questão. (Alberts e cols., 1989).

Em nossos experimentos de cultivo *in vitro* de mfs. realizamos o estudo do processo de diferenciação relacionado às condições ambientais no que se refere ao meio de cultivo, temperatura, adição ou não de fatores nutricionais ou controladores de pH.

É sabido que a diferenciação da célula ou tecido, é a expressão externa de eventos regulatórios que controlam a síntese de RNA e proteínas específicas. A ativação gênica em vários sistemas de diferenciação pode ocorrer independentemente, devido a fatores internos e característicos do sistema ou em outros pontos do desenvolvimento, com a participação de agentes indutores do processo. A questão chave que vem acompanhando as pesquisas direcionadas ao processo de diferenciação, seja a nível celular ou de organismo como um todo, é saber quais os fatores específicos responsáveis pela indução deste processo.

Os resultados dos nosso experimentos indicaram que a condição crítica para o desencadeamento do processo de diferenciação foi a temperatura: somente a 28°C foram observadas as formas larvais do parasita. A 28°C a viabilidade das mfs. foi menor que a 37°C, mas observamos até 67% de formas IV ("salsicha") no 16º dia. As

modificações morfológicas apresentadas pelas mfs. correspondem àquelas observadas *in vivo* no hospedeiro intermediário. Estes experimentos levantaram uma importante questão: se as condições de cultivo puderem ser melhoradas, no sentido de obter-se maior viabilidade, será possível induzir-se *in vitro* a diferenciação do parasita até a larva infectante? A adição de nutrientes provenientes de extrato celular de insetos vetores do parasita pode ser um estímulo adicional para que o processo se complete. Entretanto, nas nossas condições, não notamos modificações em alguns dos experimentos, após a adição de um extrato obtido com drosófilas.

Ainda sobre a temperatura, esta tem-se mostrado um fator importante na indução do processo de diferenciação em filarídeos. Assim, em um dos trabalhos pioneiros nesta área, Coutelen (1929) observou estágios iniciais de diferenciação de mfs. de *W. bancrofti* a temperatura ambiente. Neste mesmo parasita, Kharal e cols. (1980) descrevem diferenciação até a forma IV em meio 199 com 10% de soro humano inativado, a 27° C. Ando e cols. (1980a) cultivaram mfs. de *D. immitis* a 27° C e 36° C, observando formas diferenciadas apenas na primeira condição. É interessante notar que, dos quatro meios de cultivo utilizados por estes autores, apenas dois (M-41 e NcTC-109) induziram as transformações. No meio TC-199 não ocorreu a diferenciação, contrariamente aos nossos resultados com *W. bancrofti*.

Uma possível explicação para o efeito da temperatura na indução da diferenciação das mfs. em larvas, decorre do fato de que, no hospedeiro definitivo (mamíferos) os embriões encontram-se à temperatura de 37°C. Por outro lado, nos mosquitos (ou outros insetos, hospedeiros intermediários) a temperatura interna é menor que 30°C. Assim este pode ser um dos fatores que induzem a transformação dos embriões em infecções naturais.

Ando e Kitamura (1982) descrevem experimentos que apontam a pressão osmótica do meio como outro fator determinante da diferenciação em mfs. de *D. immitis*. A pressão osmótica mais favorável a este processo é maior que a do hospedeiro definitivo dos parasitas (o cão). Os autores sugerem a possibilidade de que o desenvolvimento dos embriões na forma "salsicha" seja devido à maior pressão osmótica encontrada no intestino do mosquito quando são ingeridos.

Devido ao número relativamente pequeno de larvas diferenciadas por nós obtidas, não foi possível fazer-se uma caracterização antigênica mais detalhada destes estádios. Os testes de imunofluorescência entretanto demonstraram que ao menos algumas das proteínas de superfície expressas pelas mfs. são mantidas nos estádios larvais.

Com os experimentos em que utilizamos CEP, em presença de soro imune de camundongo, verificamos uma aderência preferencial às extremidades dos parasitas, sem

que entretanto esta aderência afetasse a motilidade dos mesmos. Em alguns experimentos quando adicionamos soro fresco de camundongo, o nível de aderência aumentou e a motilidade das mfs. foi afetada indicando uma cooperação dos anticorpos presentes no soro de camundongo imune com o sistema de complemento presente no soro fresco. Em contrapartida, alguns soros com ou sem adição de soro fresco induziram uma alta proporção de mfs. com CEP no primeiro dia do experimento, mas não nos dias 3 e 7, sendo diretamente dependente de maiores concentrações do soro. Este fato ocorreu mesmo na ausência de soro imune.

Aggarwal e cols. (1985) utilizando anticorpo monoclonal e adição de soro fresco de camundongo, em cultivo de mfs. de *Brugia malayi* observaram que o nível de aderência e morte das mfs. foi visivelmente aumentada, sugerindo uma participação importante do complemento naquele sistema.

Com relação aos soros humanos, apenas dois soros foram significantes na diminuição da viabilidade das culturas: o nº 6 (de indivíduo assintomático) e o nº 42 (de indivíduo portador de parasitose), onde a viabilidade caiu para 42% e 45% respectivamente, no dia 7 sem complemento. Após a adição de complemento causaram a morte de 100% das mfs. dentro de 24 h. Assim, o complemento adicionado foi o fator responsável pela perda total da viabilidade das mfs..

Outros soros humanos imunes não foram significantes

na perda da viabilidade das mfs. com ou sem adição de complemento. Como o soro nº 6 possuía uma taxa elevada de eosinófilos, embora dentro dos limites, e o soro nº 42 era hipereosinófilo (quase o dobro de eosinófilos do primeiro), podemos sugerir que possivelmente a presença elevada de eosinófilos, juntamente com a adição de complemento e ainda mais algum fator presente nestes soros, tenha mediado uma maior aderência de CEP e morte de microfilárias. Muito embora a análise estatística realizada não tenha mostrado correlação significativa entre o número de eosinófilos de pacientes sintomáticos e assintomáticos, com a porcentagem de aderência de CEP aos parasitas, não podemos descartar a existência de um papel dos mesmos, juntamente com outros fatores, na indução de aderência de CEP à microfilárias. Apesar do pequeno número de soros utilizados verificamos uma diferença nas médias obtidas com os soros de pacientes com diferentes sintomas clínicos.

A indução de um mecanismo de destruição anticorpo-dependente e mediado por eosinófilos em helmintos já foi observada por Kazura e Grove (1978). Estes verificaram que a adição de CEP contendo mais que 20% de eosinófilos em presença de soro de camundongo imune, causou a morte *in vitro* de 99% de larvas de *Trichinella spiralis*.

Analisando todos os dados podemos afirmar que a adição de soro fresco de camundongo com soros de camundongos imunes ou com soros humanos imunes foi eficiente na indução de aderência das CEP às mfs..

Com relação ao aproveitamento do meio de cultivo durante ou após os experimento de cultivo *in vitro* de mfs., realizamos a análise destes meios em ELISA para verificar a existência de antígenos E/S. Todos os soros de camundongos imunes ou de pacientes com filariose bancroftiana, bem como os anticorpos monoclonais testados foram em maior ou menor grau, úteis na detecção de antígenos E/S. No entanto, acreditamos que um processamento mais refinado destes antígenos possam levar a resultados mais fortes e relevantes no que se refere à detecção destas proteínas por ELISA.

Outro fato a considerar, é a necessidade de realizar-se a purificação e análise bioquímica destas proteínas e outros fatores presentes no meio, para verificação da presença dos mesmos antes e após o cultivo com mfs., como tem sido feito por outros pesquisadores a partir de experimentos como estes. Assim, a composição de aminoácidos ou glicose nos meios, antes e após o cultivo, foi determinada com mfs. de *D. immitis* e de *B. pahangi* (Ando e cols., 1980b; Howells e Chen, 1981 respectivamente).

Os dados aqui obtidos, embora preliminares, forneceram informações relevantes e úteis para o estudo do processo de diferenciação de filarídeos. O objetivo final destas pesquisas é a obtenção de um quadro completo das condições indutoras responsáveis pelo desenvolvimento destes organismos, bem como pelo controle imunogenético dos mecanismos da resposta imune que diferencia cada um destes sistemas.

## 5 RESUMO E CONCLUSÕES

O verme *Wuchereria bancrofti* (Filarioidea) é o principal filarídeo causador de filariose linfática no homem. No presente trabalho utilizamos microfilárias (mfs., forma embrionária) deste parasita, obtidas do sangue de indivíduos infectados, provenientes de Recife (PE) e áreas vizinhas, onde a doença é endêmica.

As mfs. isoladas do sangue, foram processadas para a obtenção de diferentes preparações antigênicas: mfs. íntegras-WBI; extrato protéico solúvel, obtido por rompimento dos vermes em ultra som-WBT; sobrenadante de WBT-WBS e o precipitado de WBT-WBPPT.

Os antígenos foram utilizadas para diversas finalidades: ELISA, imunizações de camundongos, eletroforese, marcação radioativa, imunofluorescência, "Western blotting" e cultivo *in vitro*.

Análises por Elisa mostraram que todas estas preparações induziram em camundongos uma resposta imune,

destacando-se as preparações WBS e WBI. De 5 a 10 ug/ml de proteínas de cada amostra de WBS foram suficientes na detecção de anticorpos anti *W. bancrofti* em ELISA.

Um estudo da resposta imune em camundongos, com as diferentes preparações antigênicas, evidenciou uma reação mais forte (em ELISA) dos soros anti WBS comparadas com os soros anti WBI após a terceira imunização (100 ug/dose/camundongo e 200 ou 300 mfs./dose/camundongo respectivamente); Deve-se ainda considerar que a formação de complexo imune circulante é possivelmente maior nos camundongos imunizados com WBS, diminuindo assim o título de anticorpos circulantes anti WBS.

Os soros de camundongos imunizados com as diferentes preparações antigênicas de *W. bancrofti* foram testados a cada dose e os mais positivos estocados para utilização em outros testes. Os animais considerados bem imunizados foram selecionados para sacrifício e utilização do baço na produção de hibridomas. Dentre estes a produção de anticorpos monoclonais (AcMn) foi realizada com um exemplar imunizado com três doses de 200 mfs. e os seguintes clones foram obtidos: 3H4, 4H2, 6E2 e 7E3. Alguns subclones foram selecionados para estudos posteriores. Os AcMn foram úteis na detecção de antígenos de *W. bancrofti* em ELISA, porém não apresentaram forte reação após transferência dos antígenos migrados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS ao papel de nitrocelulose-NC ("Western



blotting"). Descartamos o problema de técnica, tendo em vista que houve detecção de antígenos em NC quando da utilização de soros de camundongos imunes (anticorpos policlonais). É possível que os AcMn produzidos e utilizados fossem dirigidos a pequenas frações protéicas não transferidas ao papel de NC.

Quanto à caracterização antigênica de mfs. de *W. bancrofti*, realizamos a migração de proteínas por SDS-PAGE e obtivemos a marcação de bandas apenas com a utilização de WBPPT. Assim, detectamos uma banda de peso molecular (PM) entre 55 e 70 kDa, uma menor de PM entre 40 e 45 kDa e uma terceira de PM entre 10 e 20 kDa. Acreditamos que a possível perda de proteínas por degradação foi responsável pelo pequeno número de frações obtidas em gel, tendo em vista que a concentração protéica obtida após o rompimento dos parasitas, centrifugação e concentração, era suficiente para a detecção de um maior número de bandas.

O fato acima levou-nos a realizar a marcação radioativa de mfs. de *W. bancrofti* com I<sup>131</sup>, objetivando definir melhor um padrão protéico de bandas. Assim, proteínas de superfície (PS) e proteínas internas + proteínas de superfície (IS) foram radioativamente marcadas, processadas e postas para migração por SDS-PAGE. Com o precipitado de PS três distintas bandas foram detectadas, com PM semelhantes aos obtidos com SDS-PAGE de WBPPT. Com o sobrenadante de PS não detectamos nenhuma banda. Com o

precipitado de IS observamos algumas bandas de PM semelhante às observadas com o precipitado de PS. Quanto ao sobrenadante de IS não detectamos bandas definidas, porém em algumas das marcações observamos uma banda levemente marcada de PM entre 50 e 80 kDa.

Os resultados acima forneceram mais informações a respeito das proteínas de mfs. de *W. bancrofti*, no entanto, muitos outros estudos precisam ser realizados, para definir e caracterizar estes antígenos, sendo necessário adaptar ainda mais a técnica de iodinação com estes parasitas.

131

Ainda com I, foi realizada imunoprecipitação com sobrenadante de PS e IS, utilizando soros de camundongos anti WBS e anti antígenos de *L. carinii*. A revelação, embora com forte reação de "background", evidenciou a precipitação de duas bandas (uma de PM entre 50 e 80 e outra de PM entre 10-20 kDa) com ambos os anti-soros no sobrenadante de PS. Isto indica que os anticorpos foram dirigidos a estas bandas específicas e presentes na superfície do parasita, já que com o uso destes mesmos anticorpos não foram detectadas bandas com o sobrenadante de IS. É possível que os antígenos detectados apresentassem determinantes comuns aos dois parasitas, daí o reconhecimento e precipitação por ambos os anti-soros. Entretanto temos de considerar que utilizamos, neste caso, anticorpos policlonais, onde inúmeros anticorpos podem ser dirigidos contra diferentes determinantes antigênicos de

diferentes antígenos.

Um outra banda não bem definida foi detectada apenas com o anti-soro anti WBS.

Num outro estudo objetivando detectar anticorpos a sítios antigênicos específicos do parasita, realizamos a imunofluorescência indireta com anticorpos-IFAT e constatamos que os soros imunes de camundongos anti WBI bem como um AcMn (subclone 146B8) reagiram em sítios localizados principalmente nas extremidades do parasita. Observamos a mesma reação com os soros humanos imunes. Não houve fluorescência específica com os soros de camundongos anti WBS. Outro fato é que os anticorpos mostraram reação mais forte quando o conjugado (anticorpo secundário) utilizado nestes testes era anti-IgG e não anti-IgM. Assim, os anticorpos são possivelmente de classe IgG. Estes resultados foram obtidos sempre com mfs. íntegras postas em lâmina no momento da reação final ou seja, o antígeno não foi previamente fixado, evitando reações inespecíficas.

Finalmente realizamos o cultivo *in vitro* de mfs. de *W. bancrofti*, objetivando o estudo preliminar das condições indutoras do processo de diferenciação destes parasitas.

Algumas conclusões obtidas com este estudo foram:

O parasita é bastante resistente ao cultivo *in vitro*, mesmo após o estresse a que é submetido quando do seu isolamento do sangue, mostrando viabilidade média próxima a 100% nos primeiros dias;

O parasita suporta bem temperaturas de 28°C e 37°C, sendo a de 37°C onde melhor se manteve;

Dos três meios de cultivo empregados, MEM, 199 e RPMI 1640, apenas no 1º o parasita não foi capaz de sobreviver além de 4 dias;

A diferenciação ocorre nos meios 199 ou RPMI somente a 28°C; e as modificações morfológicas observadas correspondem as que ocorrem *in vivo* no hospedeiro intermediário (formas I, II, III e IV);

O uso de soro fetal bovino ou soro humano normal foi essencial para a manutenção das mfs. podendo o soro ser substituído por "células alimentadoras" sob a forma de uma camada de células de exudato peritoneal murino-CEP;

Alguns soros humanos imunes + o sistema de complemento (de soros normais) induziram uma maior número de células aderentes (CEP) aos parasitas, indicando que aqueles soros possivelmente possuíam mais anticorpos específicos que outros soros humanos imunes testados.

A análise dos dados obtidos sobre a aderência de CEP aos parasitas quando do uso de soros humanos imunes, não revelou correlação estatisticamente significante entre número de eosinófilos e a porcentagem de aderência de CEP à mfs. durante cultivo *in vitro*. É possível entretanto, que haja uma relação entre eles, pois houve diferença entre as médias de aderência de CEP com os soros de pacientes com diferentes sintomas clínicos e assintomáticos. Outro fato a

considerar é o pequeno número de amostras que utilizamos;

As mfs. liberam durante o cultivo *in vitro*, produtos de excreção e/ou secreção, detectados por ELISA com soros imunes (humano ou de camundongo) ou AcMn anti *W. bancrofti*. Os resultados indicaram que estes antígenos podem ser bastante úteis em estudos de filariose bancroftiana.

Muitos estudos estão novamente se voltando para o cultivo *in vitro* de filarídeos. Este estudo permitiu levantar entre outras questões de primeira importância as seguintes:

A temperatura bem como os fatores de crescimento, provenientes do meio de cultivo ou liberados por células alimentadoras, são pontos-chave no processo de diferenciação;

Este sistema experimental permite prever-se a possibilidade de, melhorando-se as condições de cultivo no que se refere à viabilidade, induzirmos a diferenciação até a forma de larva infectante;

A comparação dos estudos feitos por diferentes laboratórios, quanto às necessidades nutricionais e às condições indutoras do processo de diferenciação de vários filarídeos, pode indicar o grau de semelhança genética entre eles.

Os estudos de cultivo *in vitro* aqui realizados, confirmaram a importância dos mesmos por outros

pesquisadores e deram-nos informações importantes para estudos posteriores sobre a diferenciação deste e de outros filarídeos.

Quanto ao parasita **Litomosoides carinii**, utilizamos o verme adulto bem como ovos/embriões, extraídos de fêmeas adultas. As preparações antigênicas foram obtidas da mesma forma como para **W. bancrofti**. E, entre estas, a que induziu maior título de anticorpos foi o precipitado de vermes adultos- LCPPTA, muito embora todas as demais preparações tenham sido bastante imunogênicas.

Um estudo da resposta imune em camundongos BALB/c com diferentes doses de ovos/embriões íntegros revelou que a resposta é dose-dependente, aumentando com o número de imunizações. Além do mais as imunizações por via endovenosa foram melhores na produção de anticorpos que as por via intraperitoneal, indicando uma tolerância maior ao antígeno por esta última via.

Vários testes ELISA demonstraram reatividade cruzada entre **L. carinii** (LC) e **W. bancrofti** (WB). No entanto, os soros anti LC reagiram positivamente de forma mais intensa na detecção de antígenos de WB que os soros anti WB na detecção de antígenos de LC.

Não houve reação dos soros anti LC contra o soro de rato não imune, hospedeiro definitivo de **L. carinii**, indicando que o parasita não apresenta proteínas do hospedeiro aderidas à cutícula em grande quantidade.

Os resultados obtidos levam-nos a concluir que os antígenos e anti-soros de **L. carinii**, que são mais facilmente disponíveis que os de **W. bancrofti** podem ser utilizados como substitutos a estes últimos na detecção de anticorpos ou antígenos em infecções com **W. bancrofti**, já que existe similaridade genética entre estes dois nematódeos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com LCPPTA detectou três distintas bandas, uma de PM entre 66 e 80 kDa, outra entre 30 e 43 kDa e uma terceira entre 20 e 30 kDa (com uma adicional sob condições redutoras). Outras bandas não definidas foram observadas, sendo estas situadas entre 43 e 80 kDa.

Com o sobrenadante de extrato protéico de ovos e embriões apenas duas bandas definidas foram detectadas, com PM entre 70 e 80 kDa e outra de PM entre 20 e 30 kDa.

Anticorpos monoclonais contra este parasita foram produzidos a partir de um camundongo imunizado com ovos e embriões. Os seguintes clones anti **L. carinii** foram obtidos: 3C11, 5B10, 4A11, 3G12 e 4C7. Estes monoclonais foram utilizados na detecção de antígenos de **L. carinii** ou **W. bancrofti** por ELISA e "Western blotting" e apresentaram-se bastante sensíveis e específicos ao parasita **L. carinii**. Alguns deles foram testados para verificar reatividade com soro humano imune de pacientes com filariose bancroftiana, entretanto não apresentaram valores significativos por

ELISA.

A transferência de proteínas em gel de poliacrilamida ao papel de nitrocelulose foi realizada e os anti-soros anti LC bem como os AcMn anti LC, utilizados na detecção destes antígenos. Os resultados indicaram o reconhecimento por ambos os reagentes de uma banda bem definida correspondente à observada em gel com coloração convencional de PM entre 20 e 30 kDa.

IFAT com ovos/embriões de **L. carinii** evidenciou sítios antigênicos bem definidos ao longo da superfície dos parasitas, sendo a fluorescência específica aos anti-soros anti **L. carinii**.

Todos os experimentos aqui descritos evidenciaram que, apesar das dificuldades encontradas ao utilizar material antigênico de filarídeos, principalmente de **W. bancrofti**, este é um campo de pesquisas bastante fértil e aberto a vários tipos de investigação. A busca de alternativas em parasitas como **L. carinii**, que mostrou-se um bom material de estudo, é ainda outra possibilidade a ser considerada.



## S U M M A R Y   A N D   C O N C L U S I O N S

*Wuchereria bancrofti* (Filarioidea) is the major lymphatic filarial parasite of man.

In the present work we utilized microfilariae (mfs, embrionary form) of *W. bancrofti* obtained from blood of infected individuals from Recife-PE and other areas next to that city where filariasis is endemic.

The mfs. isolated from blood were processed for the obtention of different antigenic preparations (whole mfs., WBI; soluble proteic extract, obtained by disruption of worms after sonication, WBS; precipitated fraction of WBS, WBPPT and the crude proteic extract-WBT).

The antigens were utilized for different finalities: ELISA, immunizations of mice, electrophoresis, western blotting, radiolabelling, immunofluorescence and *in vitro* cultures.

ELISA analysis showed that all the preparations elicited in mice an immune response, particularly the

preparations WBS and WBI. From 5 to 10 ug/ml proteins of *W. bancrofti* were sufficient for the detection of anti filarial antibodies in ELISA.

Our studies about the immune response in mice with the antigenic preparations evidenced a more strong reaction (in ELISA) of the anti WBS serum compared to the anti WBI serum after the third immunization (100 ug/dose/mouse and 200 or 300 mfs/dose/mouse respectively).

It is possible that the formation of circulating immune complexes is more frequent in the mice immunized with WBS, decreasing thus the titer of anti WBS circulating antibodies.

The serum of mice immunized with the different antigenic preparations of *W. bancrofti* were tested and the more positive ones were stored for utilization in other tests. The animals considered well immunized were selected for sacrifice and utilization of spleen for the production of hybridomas. The production of monoclonal antibodies (AcMn) was achieved with a mouse immunized with three doses of mfs. and the following clones were obtained: 3H4, 6E2, 7E3 and 4H2. More subclones were selected for posterior utilization in other studies. These AcMn were useful in the detection of antigens of *W. bancrofti* in ELISA, but they did not show sufficient positive reaction after transfer of antigens from polyacrylamide gel to nitrocellulose paper-NC (Western blotting). We discarded the possibility of

preparations WBS and WBI. From 5 to 10 ug/ml proteins of *W. bancrofti* were sufficient for the detection of anti filarial antibodies in ELISA.

Our studies about the immune response in mice with the antigenic preparations evidenced a more strong reaction (in ELISA) of the anti WBS serum compared to the anti WBI serum after the third immunization (100 ug/dose/mouse and 200 or 300 mfs/dose/mouse respectively).

It is possible that the formation of circulating immune complexes is more frequent in the mice immunized with WBS, decreasing thus the titer of anti WBS circulating antibodies.

The serum of mice immunized with the different antigenic preparations of *W. bancrofti* were tested and the more positive ones were stored for utilization in other tests. The animals considered well immunized were selected for sacrifice and utilization of spleen for the production of hybridomas. The production of monoclonal antibodies (AcMn) was achieved with a mouse immunized with three doses of mfs. and the following clones were obtained: 3H4, 6E2, 7E3 and 4H2. More subclones were selected for posterior utilization in other studies. These AcMn were useful in the detection of antigens of *W. bancrofti* in ELISA, but they did not show sufficient positive reaction after transfer of antigens from polyacrylamide gel to nitrocellulose paper-NC (Western blotting). We discarded the possibility of

technical problems as there was a clear detection of antigens in NC paper when we utilized mouse immune serum (policlonal antibodies). It is possible that the AcMn produced and utilized were directed to small proteic fractions not transferred to the NC paper.

For the antigenic characterization of *W. bancrofti* mfs. we analysed the proteins by SDS-PAGE. However, we obtained proteic bands only with the WBPPT fraction, after conventional staining by Coomassie blue. We detected three bands, with molecular weight (PM) between 55-70 kDa, 40-45 kDa and 10-20 kDa respectively. We believe that the lack of other protein bands was caused by proteolytic degradation.

In an attempt to define a better proteic pattern of bands, we realized the radiolabelling of mfs. with <sup>131</sup>I. Thus surface (PS) and internal + surface (IS) proteins were radiolabelled, processed and separated by SDS-PAGE.

When we utilized the precipitate of PS, three distinct bands were detected with PM similar to the those obtained by SDS-PAGE of WBPPT. With the supernatant of PS we did not detect any band. With the precipitate of IS, we observed some bands more or less at the same line of the bands observed with the precipitate of PS, but with the supernatant of IS we did not detect defined bands. However in one of them we observed a fraction of PM between 50 and 80 kDa. These results were useful for the analysis of proteins of mfs. of *W. bancrofti*, but many other studies

have to be realized to define and to characterize these antigens.

The immunoprecipitation of PS and IS supernatant was made with anti *W. bancrofti* or *Litomosoides carinii* mouse sera. Two bands were detected in the PS supernatant (one of PM between 50-80 kDa and other of PM between 10-20 kDa) with both the antisera. The recognition and precipitation of antigens by both antisera shows the existence of cross-reactivity between both antigens. In the supernatant of IS we detected a band not well defined with the anti *W. bancrofti* serum. This results can indicate that the antibodies were directed to antigenic determinants presents in the surface of the parasites. However these studies were realized with policlonal antibodies, where many kind of antibodies can be directed against different antigenic determinants from different antigens.

Immunofluorescence analyses with anti WBI antiserum showed positive reaction in sites localized mainly in the extremities of the parasite. In addition we observed the same reaction with human immune sera. No fluorescence was observed with the anti WBS sera. The subclone 146BB was the only monoclonal antibody that showed immunofluorescence with mfs.. The antibodies showed more positive reaction when the secondary antibody utilized in this test was anti-IgG and not anti-IgM, showing that the antibodies are possibly of IgG class.

We realized *in vitro* cultures of mfs. of *W. bancrofti* in an attempt to realize a preliminary study of the conditions responsible for the process of differentiation in these parasites. Some conclusions obtained were:

- The parasite is very resistant to the *in vitro* cultures, even after the stress to which it is submitted at the moment of its isolation from blood, and shows mean viability next to 100% in the first days;

- The parasite supports well temperatures of 28°C and 37°C, but 37°C was the best for its maintenance;

- Among the three culture media employed, MEM, 199 and RPMI 1640, just in the first one the parasite was not able to survive for over four days;

- The differentiation was observed in parasites cultures in the media 199 ou RPMI 1640 only at 28°C and the morphological changes were similar to those observed *in vivo* in the intermediary host (forms I, II, III and IV).

- The use of fetal bovine serum was essential for the maintenance of mfs., but the sera may be replaced by "feeder cells" such as a layer of murine peritoneal exudate cells - CEP;

Some immune sera + complement system (from normal sera) induced more adherence of murine peritoneal exudate cells to mfs., indicating that in those sera could exist more specific antibodies than other immune sera utilized.

Statistic analysis did not show significant correlation between numbers of eosinophils (from patients) with percents of adherent CEP to the parasites, but we believe that some relation can exist between both the variables, as we worked with a small number of samples.

- The mfs. release during *in vitro* cultures excretion/secretion products detected by ELISA with human/or mouse sera and anti *W. bancrofti* monoclonal antibodies and these antigens can be useful for studies in bancroftian filariasis.

Various studies are being made with *in vitro* cultures of nematodes. The present study permits highlighted some important points:

- The growing factors present in serum released by feeder cells as well as a temperature lower than that of the definitive host are crucial in the differentiation process;

- This experimental system opens the possibility of improving the culture conditions so that the differentiation process can continue until the infective larvae develop;

- The comparison of studies done by various laboratories in relation to nutritional necessities and the conditions responsible for differentiation of filarial parasites can indicate the grade of genetic similarity among them.

In relation to the worm *Litomosoides carinii* we utilized the adult and the eggs/embryos extracted from

adult female. The antigenic preparations and analytical tests were the same employed for *W. bancrofti*, except for radiolabelling experiments and *in vitro* cultures.

All the antigenic preparations were immunogenic, but the precipitated fraction of adult worms induced the highest antibody titers in mice.

A study about the immune response in mice with different doses of eggs/embryos showed that the response is dose-dependent and increases with the number of immunizations. Immunization by endovenous via was more efficient than by intraperitoneal via.

ELISA tests showed cross-reactivity between *L. carinii* and *W. bancrofti* proteins. The anti *L. carinii* sera however were more significant in the detection of filarial antigens of *W. bancrofti* than the opposite case.

There was no reaction of the anti *L. carinii* sera against rat sera, definitive host of *L. carinii*, indicating that the parasite does not present host proteins adsorbed to the cuticle in large quants.

With the results obtained we can concluded that the antigens of *L. carinii*, more easily available than *W. bancrofti* can be used as substitute for *W. bancrofti* proteins, because of the genetic similarity existing between the parasites.

Polyacrylamide gel electrophoresis of the precipitated fraction of *L. carinii* adult worms detected



some distinct bands (PM between 20-30 kDa; 30-43 kDa and 66-80 kDa). Other bands not well defined also were observed (PM between 43-80 kDa).

With the supernatant of eggs/embryos proteic extract some defined bands were observed (PM between 20-30 kDa and 70-80 kDa).

Monoclonal antibodies-AcMn against these parasites were produced from one mouse immunized with eggs and embryos. The following clones were obtained: 3C11, 5B10, 4A11, 3G12, and 4C7. These AcMn were utilized in the detection of antigens of *L. carinii*/*W. bancrofti* by ELISA and Western blotting. They were more sensitive and specific to the first parasite.

Some anti *L. carinii* clones were tested for reactivating against sera of patients with clinical symptoms of filariasis, but the results were not significant by ELISA.

The western blotting analysis of *L. carinii* proteins with anti *L. carinii* sera and AcMn showed recognition, by both reagents of a band corresponding to that observed by SDS-PAGE and staining with Coomassie blue, of molecular weight between 20-30 kDa.

Immunofluorescence studies with eggs/embryos evidenced antigenic sites well defined at the parasite surface. This fluorescence was specific to *L. carinii*, thus in this test it is preferable to use homologous

antigens.

All the experiments that we realized, evidenced that in spite of the difficulties in working with antigenic material from filarial parasites, particularly *W. bancrofti*, this is a field open to many kinds of investigations.

In addition, we can utilize other parasites like *L. carinii* that presents cross-reactivity with *W. bancrofti* and has been a good material of study in bancroftian filariasis.

ANEXO

TABELA 3.5 RESULTADOS DO CULTIVO IN VITRO DE MICROFILÁRIAS DE *W. bancrofti* COM CÉLULAS DE EXUDATO PERITONEAL E SORO IMUNE

Soro/diluição	Viabilidade (%)			Motilidade (%)			% Aderência			Nº Cél. Aderentes		
	1*	3*	7*	1	3	7	1	3	7	1	3	7
SNCa** 1/5	100	100	82	5	4	3	21	0	0	5	0	0
	100	100	84	5	4	3	25	0	0	5	0	0
" 1/20	100	100	90	5	5	3	52	0	0	10	0	0
	95	90	98	5	5	3	47	0	0	10	0	0
" 1/80	100	93	92	5	5	5	70	0	0	7	0	0
	100	91	80	5	4	3	12	0	5	3	0	3
" 1/380	100	100	84	5	5	4	11	0	10	5	0	7
	100	100	80	5	4	3	10	0	10	5	0	4
8b 1/5	100	97	95	5	3	2	51	0	0	8	0	0
	100	93	91	5	3	1	48	0	0	8	0	0
" 1/20	100	94	89	5	4	3	15	0	0	6	0	0
	100	86	81	5	3	2	8	0	0	3	0	0
" 1/80	100	100	100	4	4	3	11	0	0	3	0	0
	100	100	92	4	4	2	10	0	0	3	0	0
" 1/320	100	100	95	5	5	3	0	0	0	0	0	0
	100	100	84	5	4	2	0	0	0	0	0	0
22 1/5	100	100	97	5	4	3	7	5	5	2	5	5
	100	100	93	5	3	1	6	4	5	2	5	5
" 1/20	100	92	88	5	5	2	70	5	6	10	5	6
	100	100	92	5	5	2	74	5	5	11	5	4
" 1/80	100	100	100	5	5	3	65	0	0	9	0	0
	100	100	92	5	4	2	30	0	0	5	0	0
" 1/320	100	100	94	5	5	3	5	0	0	2	0	0
	100	100	90	5	5	3	4	0	0	2	0	0
3b 1/5	100	100	82	5	4	3	0	0	0	0	0	0
	100	100	80	5	3	1	0	0	0	0	0	0
" 1/20	100	100	100	5	4	4	10	0	0	3	0	0
	100	100	100	5	4	4	11	0	5	3	0	5
" 1/80	93	92	92	4	4	4	0	0	0	0	0	0
	95	95	90	4	4	3	0	0	0	0	0	0
16 1/380	97	95	90	5	5	4	0	0	0	0	0	0
	100	90	90	4	4	3	0	0	0	0	0	0
16 1/5	93	90	84	5	3	3	0	0	0	0	0	0
	81	80	80	5	2	2	0	0	0	0	0	0
" 1/20	100	96	91	5	3	3	0	0	0	0	0	0
	100	90	90	5	3	3	0	0	0	0	0	0
" 1/80	100	100	100	5	5	5	5	0	0	3	0	0
	100	100	91	4	4	4	5	0	0	3	0	0
" 1/380	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	93	5	4	4	0	0	0	0	0	0
SHN***	100	92	90	5	5	5	13	0	0	3	0	0
	100	89	83	5	4	4	0	0	0	0	0	0
3	100	100	96	4	4	4	5	3	0	2	5	0
	100	100	94	5	4	2	5	12	11	4	8	5
4	100	100	93	5	5	4	6	10	0	3	3	0
	100	95	92	5	3	3	0	8	0	0	3	0

continua...

continuação

TABELA 3.5 RESULTADOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE MICROFILÁRIAS DE *W. bancrofti* COM CÉLULAS DE EXUDATO PERITONEAL E SORO IMUNE

Soro/diluição	Viabilidade (%)			Motilidade (%)			% Aderência			Nº Cél. Aderentes		
	1*	3*	7*	1	3	7	1	3	7	1	3	7
5	100	91	86	5	5	3	10	0	0	5	5	0
	100	90	82	5	5	3	13	0	0	5	5	0
6	100	100	100	5	5	3	0	10	13	0	0	4
	81	64	42	3	3	2	5	17	61	5	5	12
7	100	100	100	5	5	4	0	0	5	0	0	2
	100	100	100	5	5	4	5	10	60	5	5	5
8	100	100	100	5	5	5	5	0	0	3	3	0
	100	100	100	5	3	3	0	5	12	3	3	7
9	100	100	100	5	5	5	5	0	0	0	0	0
	100	94	88	4	3	3	48	0	0	4	4	0
10	100	100	95	5	5	4	5	0	0	4	0	0
	97	96	90	5	4	3	5	3	5	5	3	3
11	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	88	87	82	5	4	4	0	0	30	0	0	5
12	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	100	5	5	5	0	8	0	0	10	0
13	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	100	4	3	3	10	22	0	4	8	0
14	100	100	100	5	5	5	5	5	0	3	2	0
	100	100	96	5	5	4	54	91	80	7	12	15
15	100	100	98	5	5	4	0	10	54	0	8	15
	91	90	90	4	4	4	5	8	49	3	8	15
31	92	90	84	3	2	1	0	0	0	0	0	0
	80	80	72	3	2	1	5	12	80	5	6	7
42	60	53	45	4	3	3	80	75	84	12	15	14
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	85	84	4	4	4	0	5	48	0	4	6
61	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	85	81	80	5	4	4	0	5	0	0	10	0
62	100	100	100	5	5	5	0	5	0	0	10	0
	100	100	100	5	5	5	0	10	0	0	10	0
63	100	100	100	5	5	5	0	23	36	0	10	4
	100	100	100	5	5	5	0	20	81	0	10	12
64	100	100	100	5	5	5	0	0	10	0	0	5
	100	100	100	5	5	5	0	0	10	0	0	5
65	96	93	90	5	5	4	21	78	10	10	10	5
	98	90	87	5	4	4	20	82	11	12	9	6
66	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	100	5	4	3	0	5	10	0	3	5
67	100	100	96	5	5	5	5	8	12	3	4	5
	96	87	85	4	4	4	10	13	9	5	7	7
68	100	100	100	5	4	4	0	0	0	0	0	0
	100	100	100	5	2	1	81	79	74	10	12	12

continua...

continuação

TABELA 3.5 RESULTADOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE MICROFILÁRIAS DE *W. bancrofti* COM CÉLULAS DE EXUDATO PERITONEAL E SORO IMUNE

Soro/diluição	Viabilidade (%)			Motilidade (%)			% Aderência			Nº Cél. Aderentes		
	1*	3*	7*	1	3	7	1	3	7	1	3	7
69	100	100	92	5	5	4	5	0	10	10	0	5
	100	94	87	4	4	4	5	52	53	10	6	8
70	100	100	100	5	5	5	10	4	0	3	3	0
	100	100	100	4	4	4	12	3	0	3	3	3
71	100	100	96	5	5	4	6	5	0	5	3	0
	100	97	91	5	4	4	9	6	5	4	8	6
72	100	100	92	5	5	5	0	54	67	0	12	12
	100	82	79	5	5	5	0	51	59	0	12	16
73	100	100	90	5	4	4	0	20	35	0	5	5
	100	93	90	5	3	2	0	81	84	0	15	17
74	100	100	91	5	5	5	0	28	42	0	8	9
	100	82	79	4	4	4	0	31	48	0	8	8
75	100	100	100	5	5	4	0	28	33	0	3	4
	100	100	100	5	5	4	0	51	59	0	5	12
76	100	100	100	5	5	5	0	19	22	0	5	6
	100	100	100	5	4	4	0	44	50	0	8	9
77	100	87	86	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	81	80	5	4	4	0	0	0	0	0	0
78	100	100	92	5	5	4	0	0	0	0	0	0
	100	93	90	3	3	2	10	12	16	7	3	6
79	100	100	90	5	5	5	0	21	28	0	5	7
	100	91	88	4	3	3	0	72	80	0	15	17
80	100	100	100	5	5	5	0	0	10	0	0	8
	100	100	100	5	5	5	0	42	49	0	10	12
106	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	91	5	5	5	0	0	0	0	0	0
107	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	92	90	90	4	4	4	0	5	10	0	5	5
110	100	100	100	5	5	5	0	0	12	0	0	3
	100	100	100	5	5	5	0	21	27	0	8	10
115	100	84	81	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	81	79	5	4	4	0	0	0	0	0	0
116	100	92	90	4	4	4	0	0	0	0	0	0
	100	70	65	4	3	2	0	0	0	0	0	0
118	92	85	80	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	90	84	84	4	4	4	0	0	0	0	0	0
119	100	90	90	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	89	85	3	3	2	0	0	0	0	0	0
121	100	100	100	3	3	3	0	0	0	0	0	0
	100	100	92	3	3	3	0	0	0	0	0	0
122	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	93	90	5	4	4	0	0	0	0	0	0
123	100	100	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	100	100	100	5	4	4	0	52	61	0	8	12

continua...

continuação

TABELA 3.5 RESULTADOS DO CULTIVO IN VITRO DE MICROFILÁRIAS DE W. bancrofti COM CÉLULAS DE EXUDATO PERITONEAL E SORO IMUNE

Soro/diluição	Viabilidade (%)			Motilidade (%)			% Aderência			Nº Cél. Aderentes		
	1*	3*	7*	1	3	7	1	3	7	1	3	7
124	100	90	88	5	5	4	0	0	12	0	0	3
	100	94	92	5	4	4	0	41	53	0	4	7
127	100	100	93	5	5	5	5	7	6	4	3	3
	100	95	91	5	4	4	0	5	10	0	3	4
128	100	100	100	5	5	5	12	4	9	4	4	4
	100	100	93	5	5	5	11	6	14	4	4	4
132	94	91	97	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	91	90	90	5	4	4	0	10	9	0	7	6
138	100	100	92	5	5	5	0	4	5	0	4	3
	100	89	83	5	5	5	0	5	7	0	4	3

\* Dias após o início do experimento.

\*\* SNCa, Soro de camundongo não imune.

\*\*\* SHN, Soro humano normal (indivíduo normal de área não endêmica)

Obs: Para cada soro, a primeira linha mostra o resultado da cultura sem a adição do complemento, enquanto na segunda o complemento foi adicionado. Os soros humanos foram testados em diluição de 1/20.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACTON, H.W. & RAO, S.S. The importance of secondary infection in the causation of filarial lymphangitis. *The Indian Medical Gazete*, **64**: 421-429, 1929.
- ACTON, H.W. & RAO, S.S. The pathology of elephantiasis of filarial origin. *The Indian Medical Gazete*, 305-314, 1933.
- AGGARWAL, A.; CUNA, W.; HAQUE, A.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. Resistance against *Brugia malayi* microfilariae induced by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *The Journal of Immunology*, **54**: 655-633, 1985.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. *Molecular cell biology*. New York, Scientific American books, 1989. 1192 p.
- AMBROISE-THOMAS, P. Immunological diagnosis of human filariases: present possibilities, difficulties and limitations. *Acta Tropica*, **31**: 108-128, 1974.
- ANDO, K.; CHINZEI, Y.; KITAMURA, S. Conditions of *in vitro* culture for development of microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *The Japanese Journal of Parasitology*, **29**(6): 483-488, 1980a.
- ANDO, K.; MITSUHASHI, J.; KITAMURA, S. Uptake of amino acids and glucose by microfilariae of *Dirofilaria immitis* *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **29**(2): 213-216, 1980b.
- ANDO, K. & KITAMURA, S. Osmotic pressure - dependent development of microfilariae of *Dirofilaria immitis* *in vitro*.

- The Japanese Journal of Parasitology, 31(3): 219-221, 1982.
- AUERBACH, A.D. Summary of the workshop on clinical and genetic heterogeneity of Fancon s anemia. 2. Genetic heterogeneity In: **Human Genetics - Proceedings of the 7th International Congress**, Berlim, 1986. Berlin Spring-Verlag; Heidelberg, F. Vogel & K. Sperling, 1987. p.397.
- BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E. VOLLER, A. Preliminary studies on the application of enzyme immuno assay in the detection of antibodies in Onchocerciasis. **Tropenmedizin und Parasitologie**, 26: 370-374, 1975.
- BELL JR., & BROWN, H.W. Studies on the microfilarial periodicity of *Litomosoides carinii*, filariid parasite of the cotton rat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 25: 137-140, 1945.
- BURNET, F.M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. **The Australian Journal of Science**, 20: 67-73, 1959.
- BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, 12: 195-203, 1981.
- CAMPBELL, A.M. Monoclonal antibody technology ; The production and characterization of rodent and human hybridomas. In: **Laboratory Techniques in Biochemistry**. Science Publishers B.V. 1984. v. 13, 265 p.
- CARLOW, C.K.S.; EDWARDS, M.K.; JAMEST, E.R.; PHILIPP, M. Monoclonal antibody to parasite antigens: A rapid immunization protocol requering small numbers of parasites. **The Journal of Parasitology**, 73(5): 1054-1057, 1987.
- CHARLWOOD, J.D. Estudos sobre a biologia e hábitos alimentares de *Culex quinquefasciatus* Say de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 9(2): 171-178, 1979.
- COURT, J.P. & STOREY, D.M. Shared antigens between *Litomosoides carinii* and its hosts *Sigmodon hispidus* and *Mastomys natalensis*. **Tropenmedizin und Parasitologie**, 32: 161-164, 1981.
- COUTELEN, F. Essai de culture *in vitro* de microfilaires de Bancroft. **Annales de Parasitologie**, 5: 399-409, 1929.



- CROSS, J.A.; MACDONALD, E.; TERMAN, V. A description of the stages in the life cycle of the filarial worm *Litomosoides carinii*. *The Journal of Parasitology*, 37(5): 425-432, 1951.
- CROSS, J.B. & SCOTT, J.A. The development anatomy of the fourth stage larvae and adults of *Litomosoides carinii*, a filarial worm of the cotton rat. *Transactions of American Microorganisms Society*, 66: 1-21, 1947.
- CULBERTSON, J.T.; ROSE, H.M.; DEMAREST, C.R. Filariasis bancrofti: Its diagnosis by immunological tests with antigen derived from *Litomosoides carinii*. *The American Journal of tropical Medicine and Hygiene*. 156-162, 1944.
- DASGUPTA, A. & BALA, S. *Litomosoides carinii* - soluble antigen in circulation and immunosuppression *in vitro*. *The Indian Journal of Medical Research*, 67:30-33, 1978.
- DES MOUTIS, A.; OVAISSI, A.; GRZYCH, J.M.; YARZABAL, L.; HAQUE, A; CAPRON, A. *Onchocerca volvulus*: detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human Onchocerciasis. *The American Society of Tropical Medicine And Hygiene*, 32(3): 533-542, 1983.
- DISSANAYAKE, S. ; GALAHITTIYAWA, S. C.; ISMAIL, M. M. Further characterization of filarial antigens by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(4): 725-730, 1983.
- DISSANAYAKE, S.; GALAHITTIYAWA, S.C.; ISMAIL, M.M. Immune complex in *Wuchereria bancrofti* infection in man. *Bulletin of the World Health Organization*, 60: 919-927, 1982.
- DISSANAYAKE, S. & ISMAIL, M.M. Antigens of *Setaria digitata*, cross reaction with surface antigens of *W. bancrofti* microfilariae and serum antibodies of *W. bancrofti* infected subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(4): 649-654, 1980a.
- DISSANAYAKE, S. & ISMAIL, M.M. ELISA in the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in man: A technique for reducing cross-reactivity. *Bulletin of The World Health Organization*, 58(4): 655-657, 1980b.
- DREYER, G. Filariasis programme - Recife - Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 82 (supl. 4): 359-360, 1987.
- DREYER, G. & COUTINHO, A. Manifestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Instituto Oswaldo Cruz , 1989 ( submetido a publicação).

- EARL, D.R. *Filaria* from the dog *in vitro*. **Annals of The New York Academic Science**, **77**: 163-175, 1959.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay for immunoglobulin G. **Immunochemistry**, **8**: 871-876, 1971.
- FENG, L. A comparative study of the anatomy of *microfilaria malayi* Brug, 1927 and *microfilaria bancrofti* - Cobbold, 1877. **Chinese Medical Journal**, **47**: 1214-46, 1933.
- FORSYTH, H.P. ; SPARK, R. ; KAZURA, J. ; BROWN, ; PETERS, P. ; HEYWOOD, P. ; DISSANAYAKE, S. ; MITCHELL, G.F. A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for detection circulating antigen in bancroftian filariasis. **The Journal of Immunology**, **134**(2): 1172-1177, 1985.
- FRANKS, M.B. Specific soluble antigen in the blood of filarial patients. **The Journal of Parasitology**, **32**(4): 400-406 1946.
- GAJANANA, A. ; RAO, U.S.B. ; MANONMANI, L.M. Preliminary study on circulating immune complexes in bancroftian filariasis. **The Indian Journal of Medical Research**, **76**(jul): 146-150, 1982.
- GONZAGA DOS SANTOS, L. ; SANTOS, D.S. ; AZEVEDO, R. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* filariasis by immunofluorescence using microfilariae as antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **70**(2): 219-225, 1976.
- GRACE, T.D.C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. **Nature**, **195**(4843): 788-790, 1962.
- GREENWOOD, F.C. ; HUNTER, W.M. ; GLOVER, J.S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochemistry Journal**, **89**: 114, 1963.
- GROVE, D.I. & DAVIS, R.S. Serological diagnosis of bancroftian and malayan filariasis. **The Journal of Helminthology**, **134**: 1172-1177, 1978.
- HAMILTON, R.G. ; HUSSAIN, R. ; OTTESEN, E.A. Immunoradiometric assay for detection of filarial antigens in human serum. **The Journal of Immunology**, **133**(4): 2237-2242, 1984.
- HARINATH, B.C. Detection and diagnostic utility of *in vitro* and *in vivo* released antigens in bancroftian filariasis. **Journal of Communicable Diseases**, **18**(4): 261-266, 1986.

- EARL, D.R. *Filaria* from the dog *in vitro*. **Annals of The New York Academic Science**, **77**: 163-175, 1959.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay for immunoglobulin G. **Immunochemistry**, **8**: 871-876, 1971.
- FENG, L. A comparative study of the anatomy of *microfilaria malayi* Brug, 1927 and *microfilaria bancrofti* - Cobbold, 1877. **Chinese Medical Journal**, **47**: 1214-46, 1933.
- FORSYTH, H.P. ; SPARK, R. ; KAZURA, J. ; BROWN, ; PETERS, P. ; HEYWOOD, P. ; DISSANAYAKE, S. ; MITCHELL, G.F. A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for detection circulating antigen in bancroftian filariasis. **The Journal of Immunology**, **134**(2): 1172-1177, 1985.
- FRANKS, M.B. Specific soluble antigen in the blood of filarial patients. **The Journal of Parasitology**, **32**(4): 400-406 1946.
- GAJANANA, A. ; RAO, U.S.B. ; MANONMANI, L.M. Preliminary study on circulating immune complexes in bancroftian filariasis. **The Indian Journal of Medical Research**, **76**(jul): 146-150, 1982.
- GONZAGA DOS SANTOS, L. ; SANTOS, D.S. ; AZEVEDO, R. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* filariasis by immunofluorescence using microfilariae as antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **70**(2): 219-225, 1976.
- GRACE, T.D.C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. **Nature**, **195**(4843): 788-790, 1962.
- GREENWOOD, F.C. ; HUNTER, W.M. ; GLOVER, J.S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochemistry Journal**, **89**: 114, 1963.
- GROVE, D.I. & DAVIS, R.S. Serological diagnosis of bancroftian and malayan filariasis. **The Journal of Helminthology**, **134**: 1172-1177, 1978.
- HAMILTON, R.G. ; HUSSAIN, R. ; OTTESEN, E.A. Immunoradiometric assay for detection of filarial antigens in human serum. **The Journal of Immunology**, **133**(4): 2237-2242, 1984.
- HARINATH, B.C. Detection and diagnostic utility of *in vitro* and *in vivo* released antigens in bancroftian filariasis. **Journal of Communicable Diseases**, **18**(4): 261-266, 1986.

- HARINATH, B.C.; MALHOTRA, A.; GHIRNIKAR, S.N.; ANNADATE, S. D.; ISAACS, V.P.; BHARTI, M.S. Field evaluation of ELISA using *Wuchereria bancrofti* mf ES antigen for bancroftian filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*, **62**(4): 941-944, 1984.
- HAWKING, F. Circadian and other rhythms of parasites. In: *Advances in Parasitology*. London, Academic Press, 1975. v.13 p. 131-184.
- HAWKING, F. The 24 hour periodicity of microfilariae: biological mechanisms responsible for its production and control. *Proceedings of The Royal Society of Britain*, **169**: 59-76, 1967.
- HAWKING, F.; SEWELL, P.; THURSTON, D.P. The mode of action of hetrazan on filarial worms. *The Britain Journal of Pharmacology*, **5**: 217-238, 1950.
- HAWKING, F. & THURSTON, J.P. The periodicity of microfilariae. I. The distribution of microfilariae in the body. II. The explanation of its production. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, **45**: 328-340, 1951.
- HOWELLS, R.E.; CHEN, S.N. *Brugia pahangi*: Feeding and nutrient uptake in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, **51**: 42-58, 1981.
- HUDSON, L. & HAY, F. *Practical Immunology*. 2 ed. London, Blackwell Scientific Publications, 1980, 359 p.
- KAGAN, I.G. A review of immunological methods for the diagnosis of filariasis. *The Journal of Parasitology*, **49**(5): 773-798, 1963.
- KALIRAJ, P.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B.C. Detection of filarial antigen in bancroftian filariasis. *The Indian Journal of Experimental Biology*, **17**(oct.): 1148-1149, 1979.
- KALIRAJ, P.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B.C. Immunodiagnosis of bancroftian filariasis: Comparative efficiency of indirect hemagglutination test, indirect fluorescent antibody test, and enzyme-linked immunosorbent assay done with *Wuchereria bancrofti* microfilarial antigens. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**(5): 982-987, 1981a.
- KALIRAJ, P.; KHARAT, I.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B.C. The utility of human filarial serum in the detection of circulating antigen. *The Journal of Helminthology*, **55**: 133-139, 1981b.

- KAPLAN, H. S.; OLSSON, L.; RAUBITSCHKE, A. Monoclonal human antibodies: a recent development with wide-ranging clinical potential. In: **Monoclonal antibodies in Clinical Medicine**. London, Academic Press, 1982, p 17-38.
- KARAVONDIN, L.M. & ASH, L.R. Circulating immune complexes in experimental filariasis. **Clinical and Experimental Immunology**, **40**: 312-317, 1980.
- KAUSHAL, N.A.; HUSSAIN, E.A.; OTTESEN, E.A. Excretory-secretory and somatic antigens in the diagnosis of human filariasis. **Clinical and Experimental Immunology**, **56**: 567-76, 1984.
- KAWASKI, K. Pathophysiological studies on filariasis. An approach to the mechanism of microfilariae periodicity by means of venous catheterisation. **The Medical Journal of Kagoshiwa University**, **9**: 34-60, 1958.
- KAZURA, J.W.; CICIRELLO, H.; FORSYTH, K. Differential recognition of a protective filarial antigen by antibodies humans with bancroftian filariasis. **Journal of Clinical Investigation**, **77**(6): 1985-1992, 1986a.
- KAZURA, J.W.; CICIRELLO, H.; MCCALL, J.W. Induction of protection against *Brugia malayi*, infection in Jirds by microfilarial antigens. **The Journal of Immunology**, **136**(4):1422-1426, 1986b.
- KAZURA, J.W. & GROVE, D.I. Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. **Nature**, **274**: 588-589, 1978.
- KERSHAW, W.E. Observations on *Litomosoides carinii* (Travassos, 1919) Chandler, 1931. III- The first stage larva in the peripheral circulation. **Annals of Tropical Medicine and Hygiene**, **43**: 238-260, 1949.
- KHARAT, I.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B.C. Immunofluorescence studies with *Wuchereria bancrofti* microfilariae ES antigen. **The Indian Journal of Medical Research**, **78**:497-502, 1983.
- KHARAT, I. & HARINATH, B.C. Antibody analysis in human filarial sera by ELISA using *Wuchereria bancrofti* microfilariae culture antigen. **The Indian Journal of Experimental Biology**, **20**: 378-380, 1982.
- KHARAT, I.; SATYANARAYANA, U.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B. C. *In vitro* Cultivation of *Wuchereria bancrofti* Microfilariae. **The Indian Journal of Experimental Biology**, **18**(nov): 1245-1247, 1980.

- KHARAT, I.; KALIRAJ, P.; GHIRNIKAR, S.N.; HARINATH, B.C. Detection & diagnostic utility of exoantigen of *Wuchereria bancrofti* microfilariae. *The Indian Journal of Experimental Biology*, **19**: 564-565, 1981.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497, 1975.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- LAL, R.B.; LYNCH, T.J.; NUTMAN, T.B. *Brugia malayi* antigens associated with lymphocyte activation in filariasis. *The Journal of Immunology*, **139**: 1652-1657, 1987.
- LITTLEFIELD, W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*, **145**: 709-710, 1964.
- LOBOS, E. & WEISS, N. Identification of non-cross-reacting antigens of *Onchocerca volvulus* with Lymphatic filariasis serum pools. *The Journal of Parasitology*, **93**: 389-399, 1986.
- LOW, G.C. The life of filarial embryos outside of the body. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **15**: 338-339, 1912.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275, 1951.
- LUCIUS, R.; SCHULZ-REY, H.; BUTTNER, D.; KERN, A.; KALTMANN, B.; PRODHON, J.; SEEBER, F.; WALTER, R.; SAXENA, K. C.; DIESFELD, H. Characterization of an immunodominant *Onchocerca volvulus* antigen with patient sera and a monoclonal antibody. *The Journal of Experimental Medicine*, **167**: 1505-1510, 1988.
- MAIZELS, R.; BURKE, J.; SUTANTO, I.; PURMONO; PARTONO, F. Secreted and surface antigens from larval stages of *Wuchereria bancrofti* the major human lymphatic filarial parasite. *Molecular Biochemistry of Parasitology*, **19**(1): 27-34, 1986.
- MAIZELS, R.M.; DENHAN, D.A.; SUTANTO, I. Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi*: Analysis of *in vitro* released components and detection of parasite products *in vivo*. *Molecular Biochemistry of Parasitology*, **17**(3): 277-288, 1985.

- MAIZELS, R.M.; PHILIPP, M.; DASGUPTA, A. PARTONO, F. Human serum albumin is a major component on the surface of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Parasite Immunology*, 6: 185-190, 1984.
- MALHOTRA, A. & HARINATH, B. C. Comparative efficiency of *Wuchereria bancrofti* microfilarial and larval excretory-secretory antigens in ELISA for the diagnosis of tropical eosinophilia and bancroftian filariasis. *The Indian Journal of Experimental Biology*, 22: 520-522, 1984a.
- MALHOTRA, A. & HARINATH, B.C. Detection & monitoring of microfilarial ES antigen levels by inhibition ELISA during DEC therapy. *The Indian Journal of Medical Research*, 194-198, 1984b.
- OLSEN, O.W. *Animal parasites - their life cycles and ecology*. 3 ed. London, University Park Press, 1974. 562 p.
- OMS - *Cuarto informe del Comité de Expertos de la OMS en filariasis*: Ginebra, 31 oct. a 9 nov. 1983. OMS, 1984.
- OTTESEN, E.A.; NEVA, F.A.; PARANJAPE, R.S.; TRIPAPHY, S.P.; THIRUVENGADAM, K.V.; BEAVEN, M.A. Specific allergic sensitisation to filarial antigens in tropical eosinophilia syndrome. *The Lancet*, 2: 1158-1161, 1979.
- OTTESEN, E. A. ; WELLER, P. F. ; HECK, L. Specific Cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *The Journal of Immunology*, 33: 413-421, 1977.
- PALMIERI, J.R.; CONNOR, D.H.; PURMONO ; DENNIS, D.T. ; MARWOTO, H. Experimental infection of *Wuchereria bancrofti* in the silvered leaf monkey *Presbytis cristatus* Eschscholtz, 1921. *The Journal of Helminthology*, 56: 243-245, 1982.
- PALMIERI, J.R.; PURMONO, ; DENNIS, D.T.; MARWOTO, H.A.; Filarid parasites of south Kalimantan (Borneo) Indonesia. *Wuchereria kalimantani* sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from the silvered leaf monkey, *Presbytis cristatus* Eschscholtz 1921. *The Journal of Parasitology*, 66(4): 645-651, 1980.
- PARANJAPE, R.S. ; HUSSAIN, R. ; NUTMAN, T. B. ; HAMILTON, R. ; OTTESEN, E. A. Identification of circulating parasite antigen in patient with bancroftian filariasis. *Clinical Immunology*, 63: 508-516, 1986.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*. 11. ed. Guanabara Koogan, 1982, 872 p.
- PHILIPP, M. & DAVIS, T.B. Biochemical and immunologic characterization of a major surface antigen of *Dirofilaria*

- immitis* infective larvae. **The Journal of Immunology**, 136 (7): 2621-2627, 1986.
- PHILIPP, M.; WORMS, M.J.; MCLAREN, D.J.; OGILVIE, B.M.; PARKHOUSE, R.M.; TAYLOR, P. M. Surface proteins of a filarial nematode: a major soluble antigen and a host component on the cuticle of *Litomosoides carinii*. **Parasite Immunology**, 6: 63-82, 1984.
- PISETSKY, D.S. Murine hybridomas producing autoantibodies from MRL mice. In: **Monoclonal Antibodies**. London, Academic Press, 1983, p. 153-172.
- PRUSSE, A.; DIESFELD, H.J.; VOLMER, S. Protein composition of various developmental stages of *Dipetalonema vitae* (Filarioidea). **The Journal of Helminthology**, 56: 251-255, 1982.
- RACHOU, R.G. Conceito e Programa de Profilaxia da Filariose Bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 12(1): 11-39, 1960.
- RACHOU, R.C.; LIMA, M.M.; FERREIRA NETO, J.A.; MARTINS, C.M. Inquérito epidemiológico de filariose bancroftiana em uma localidade de Santa Catarina, como fase preliminar de uma prova profilática. Constatação de transmissão extradomiciliar por um novo vetor *Aedes scapularis*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 7: 51-70, 1955.
- REDDY, M. V. R.; MALHOTRA, A.; HARINATH, B. C. Detection of circulating antigen in bancroftian filariasis by sandwich ELISA. (enzyme-linked immunosorbent assay) using filarial serum immunoglobulin. **The Journal of Helminthology**, 58(3): 259-262, 1984a.
- REDDY, M.V.R.; PISSENS, W.F.; HARINATH, B.C. Monoclonal antibodies against *Wuchereria bancrofti* microfilarial excretory-secretory antigens. **Journal of Bioscience**, 6 (5): 717-722, 1984b.
- RIDLEY, D.S. & HEDGE, E. C. Immunofluorescence reactions with microfilariae. 2. Bearing on host-parasite relations. **Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene**, 71(6): 522-525, 1977.
- RIPOLL, B.D. Mantenimiento *in vitro* de microfilarias. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 37: 30-36, 1985.
- SAWYER, T.K. & WEINSTEIN, P.P. The *in vitro* development of microfilariae of the dog heartworm *Dirofilaria immitis* to sausage form. **The Journal of Parasitology**, 49: 218-224, 1963.



- SCHLEMPER JR., B.R. & FERREIRA NETO, J.A. Doenças parasitárias endêmicas em Santa Catarina: I Filariose. **Arquivos da Cátedra de Medicina**, 14(2): 107-114, 1985.
- SCOTT, J.A. & MACDONALD, E.M. Immunity to challenging infections of *Litomosoides carinii* produced by transfer of developing worms. **The Journal of Parasitology**, 187-191, 1958.
- SCOTT, J.A.; MACDONALD, E.M.; TERMAN, B. A description of the stages in the cycle of the filarial worm *Litomosoides carinii*. **The Journal of Parasitology**, 37(5): 425-432, 1951.
- SIMPSON, M.G. & LAURENCE, B.R. Histochemical studies on microfilariae. **The Journal of Parasitology**, 64: 61-88, 1972.
- SRIVASTAVA, R.N. & PRASAD, B.G. The microfilarial effect of diethylcarbamazine. **The Indian journal of Medical Research**, 15(10): 1480-1486, 1970.
- STOREY, D.M. & METTIAS, E.F. Suppression of microfilaraemia in *Litomosoides carinii* infections in cotton rats by vaccination with adult worm homogenate. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 74(2): 211-218, 1980.
- STROTE, G. Successful use of a simple anaerobic system for the *in vitro* cultivation of infective larvae of *Onchocerca volvulus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 81: 174-175, 1987.
- SUTANTO, I.; MAIZELS, R.M.; DENHAN, D.A. Surface antigens of a filarial nematode: analysis of adult *Brugia pahangi* surface components and their use in monoclonal antibody production. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 15: 203-214, 1985.
- TAYLOR, A.E.R. Maintenance of filarial worms *in vitro*. **Experimental Parasitology**, 9: 113-120, 1960.
- TAYLOR, D.W.; GODDARD, J. M.; MEMAHON, J. E. Surface components of *Onchocerca volvulus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 18: 283-300, 1986.
- TOMISATO, M.; NARIVCHI, H.; VENO, J.; NAGAMI, S.; TANAKA, H.; AOKI, Y.; NAKAJIMA, Y. *Brugia pahangi*: Stage-specific antigens on microfilariae detected by serum from infected jirds or by monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, 61(1): 18-25, 1986.
- VAZ, Z. *Ackertia* gen. nov. for *Litomosa burgosi* de la Barrera, 1926, with notes on the synonymy and morphological

- variations of *Litomosoides carinii* (Travassos, 1919). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 28: 143-149, 1934
- WEIL, G.J.; JAIN, D.C.; SANTHANAM, S.; MALHOTRA, A.; KUMAR, H.; SETHUMADHAVAN, K.V.P.; LITTIS, F.; GHOSH, T.K.A. A monoclonal antibody - based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 146(2): 350-355, 1987.
- WEIL, G.J.; OTTESEN, E.A.; POWERS, K.G. *Dirofilaria immitis*: Parasite-specific humoral and cellular immune responses in experimental infected dogs. **Experimental parasitology**, 51: 80-86, 1981.
- WEINSTEIN, P.P. Development *in vitro* of the microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Litomosoides carinii*, as far as the sausage forms. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine**, 57: 236-242, 1963.
- WHO - World Health Organization - UNDP/WORLD/BANK/WHO Special programme for research and training in tropical diseases. Report of the meeting of the scientific working group in filariasis (Laboratory Workshop): application of monoclonal antibodies to immunodiagnosis and studies of antigens in filariasis. Lille, november, 14-19, 1983. S.L. OMS, 1983. (TDR/FIL/MAB-DIAG/83.3).
- WILLIAMS, R.W. Studies on the life cycle of *Litomosoides carinii*, filariid parasite of the cotton rat, *Sigmodon hispidus litoralis*. **The Journal of Parasitology**, 34: 24-43, 1948.
- WOOD, D.E. & SUIITOR, E.C. *In vitro* development of microfilariae of *macacanema formosona* in mosquito cell cultures. **Nature**, 211: 868-870, 1966.