

JANAINA CAMPOS DE MIRANDA

**Estudo da resposta imune humoral (IgG específica)
para antígenos de larvas infectantes (L3) de *Wuchereria
bancrofti*, entre portadores e não portadores de filariose
bancroftiana no Município de Olinda-PE.**

Tese apresentada ao Curso de **Doutorado
em Saúde Pública – Fundação Oswaldo
Cruz**, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Saúde
Pública.

Orientador: Dr. André Freire Furtado

Recife

2006

*A memória de meus avós (João e Maria Miranda;
José e Maria Campos), gente simples, mas
possuidores dos mais preciosos valores como: fé,
honestidade, braveza e ternura.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e seus diretores pela iniciativa junto à Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP) em criar o curso de **Doutorado Institucional em Saúde Pública**.

Aos coordenadores ao longo do curso: Dr. Eduardo Freese, Dra. Constança Simões Barboza, Dra. Maria Helena Machado, Dr. Ricardo Ventura, Dr. Carlos Machado de Freitas e Dra. Elizabeth Artmann.

Ao Prof. Dr. André Freire Furtado pela valiosa orientação.

A todos os integrantes do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães em especial aos do Departamento de Biologia Celular e Ultra-Estrutura e Departamento de Entomologia.

Às equipes do Programa de Saúde da Família (PSF) e aos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) das comunidades de Águas Compridas, Alto da Conquista e Sapucaia, do Município de Olinda-PE.

Aos meus amigos, verdadeiros amigos e aos amigos de certos momentos encontrados nesse percurso.

Aos meus pais, pela vida e pelo amor.

Aos meus filhos, pela razão de viver.

A Pedro, por sua presença.

A Deus, por sua infinita grandeza.

O sentimento cria a idéia.

A idéia gera o desejo.

O desejo acalentado forma a palavra.

A palavra orienta a ação.

A ação denota resultados.

Os resultados nos traçam o caminho das áreas infinitas do tempo.

Cada criatura permanece na estrada que construiu para si mesma.

A escolha é sempre nossa.

Ação e Caminho – Emmanuel

RESUMO

A filariose linfática bancroftiana é uma doença parasitária humana de grande complexidade em sua dinâmica de infecção, necessitando ainda de maiores esclarecimentos, principalmente, em aspectos relacionados à tolerância e imunopatologia. A existência da imunidade protetora em comunidades endêmicas de filariose permanece como objeto de intenso debate e o grupo denominado “endêmicos normais”, tem sido alvo de interesse para elucidar muitas questões referentes à imunologia da doença. O presente trabalho tem como objetivo verificar através de um estudo do tipo caso-controle, as diferenças entre portadores e não portadores de filariose linfática bancroftiana pelo reconhecimento humoral de bandas protéicas de extrato secretório-excretório de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti*. Os quatro setores censitários de Olinda-PE, com maior prevalência de filariose, foram escolhidos como área de estudo. Consideramos “grupo controle” portadores da filariose bancroftiana e “grupo de casos” os de endêmicos normais. O extrato antigênico foi obtido por incubação de larvas infectantes em meio Hanks por 72h em 5% de CO₂. As bandas protéicas foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) e por *western-blot*, transferidas e incubadas com os soros humanos. Foram considerados portadores da doença os positivos pela técnica da gota espessa ou filtração e endêmicos normais os residentes de área endêmica negativos pelo teste de detecção parasitária e captura de antígenos (Og4C3). Participaram do estudo 325 indivíduos, 130 considerados endêmicos normais e 195 portadores de filariose bancroftiana. As bandas protéicas da composição do extrato de L3 foram as de 200, 175, 138, 105, 100, 76, 55, 49, 42, 39, 38, 32, 28, 14 kDa. Na comparação do reconhecimento das proteínas entre os grupos estudados, apenas as proteínas 175 e 105 kDa não diferiram significativamente, os portadores de filariose bancroftiana não reconheceram a proteína 175 e no grupo de endêmicos normais apenas um soro foi reconhecido (0,8%). Em todas as outras, os níveis de reconhecimento dos indivíduos endêmicos normais foram superiores aos dos portadores de filariose bancroftiana. Nas proteínas de 49, 55, 100 e 200 kDa o índice foi superior a 50%. No grupo de portadores de filariose bancroftiana, das 14 bandas, 9 (64,3%) tiveram reconhecimento menor que 10%. As que apresentaram maior percentual de reconhecimento, em ambos os grupos, foram as bandas de 49 e 55 kDa. Na proteína de 200 kDa foi percebida uma grande diferença entre os grupos, pois 52,3% dos endêmicos normais a reconhecem contra apenas 4,1% dos portadores de filariose bancroftiana. Incluindo as variáveis independentes como sexo e faixa etária, no programa de regressão logística, foram excluídas do modelo as proteínas de 175, 105, 49, 100 e 39 kDa sendo as demais consideradas significantes na diferença do

reconhecimento humoral dos grupos estudados. A identificação desse grupo de proteínas respondedoras em endêmicos normais deve nortear novas pesquisas para o estudo bioquímico desses compostos e sua relação com a imunidade protetora em filariose linfática bancroftiana.

Palavras chave: 1. *Wuchereria bancrofti*, 2. Larva infectante, 3. Reconhecimento humoral.

ABSTRACT

Bancroftian filariasis is a parasitic human disease, which presents great complexity of infection dynamics, needing enlightens, mainly related to its tolerance and immunopathology. The existence of a protective immunity in endemic communities of filariasis remains object of interest and intense debate, and the group called normal endemics being the object of interest to elucidate many unsolved questions related to the filariasis immunology. The present work verified through a study of case-control, differences between carriers and non-carriers of bancroftian filariasis by humoral recognition of excretory-secretory extract of infective larvae of *Wuchereria bancrofti*. Four census tracts of Olinda-PE, which presented great prevalences of filariasis, were chosen as study areas. We considered “control group” carriers of bancroftian filariasis and “cases group” the normal endemic group. The antigenic extract was obtained by incubation of the infective larvae in Hanks medium for 72h in 5% CO₂ atmosphere. Proteic bands were separated by eletrophoresis and *western-blot*, transfered and incubated with human sera. Positive individuals for filariasis were detected by the thick smear or filtration, and normal endemics long-lived individuals in the endemic region whose test for parasite antigen detection (Og4C3) were negative. The study involved 325 individuals, 130 normal endemics and 195 bancroftian filariasis carriers. The L3 extract presented the following eletrophoretic bands: 200, 175, 138, 105, 100, 76, 55, 49, 42, 39, 38, 32, 28, 14 kDa. The pattern of protein recognition between the studied groups showed that only the proteins of 175 and 105 kDa did not differ statistically. The bancroftian filariasis carriers did not recognize the 175 kDa protein, and only endemic normal serum recognize it (0,8%). For all the others bands, the normal endemic group showed a greater pattern of recognition than the carrier group, with bands of 49, 55, 100 e 200 kDa presenting recognition greater than 50%. In the bancroftian filariasis carriers from the 14 bands, 9 (64,3%) showed recognition less than 10%. In both groups, 49 and 55 kDa bands showed the better percentual of recognition. The 200 kDa protein showed a great difference between both groups, being recognized by 52% of normal endemics, against 4,1% of the bancroftian filariasis carriers. Including independent variables as gender and age in the logistic program, the bands of 175, 105, 49, 100 e 39 kDa were excluded, because of its insignificant humoral recognition pattern, whereas all the remaining bands were considered significant in both studied groups. The identification of this group of proteins recognized as antigenic in normal endemic individuals might guide future researches in order to clarify their role in the immunity of the bancroftian filariasis.

Key words: 1. *Wuchereria bancrofti*, 2. Infective larvae, 3. Humoral recognition

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Ciclo biológico da <i>Wuchereria bancrofti</i> . 22
Figura 2	Larva infectante de <i>W. Bancrofti</i> . Microfotografia em microscopia óptica (a); Microfotografia em MEV (b). 23
Figura 3	<i>Culex quinquefasciatus</i> em hematofagia. 25
Figura 4	Forma crônica. Indivíduo apresentando hidrocele volumosa bilateral (a); Linfedema bilateral com nodulações vegetativas (b). 29
Figura 5	Forma aguda. Linfangite filarial, em membro inferior. 29
Figura 6	Mapa do Município de Olinda-PE (divisão por setores censitários). 37
Figura 7	Vista panorâmica do bairro de Águas Compridas, Olinda-PE. 38
Figura 8	Microfilária de <i>W. Bancrofti</i> (corada com hematoxilina). 40
Figura 9	Técnica de filtração de sangue através de membrana de polycarbonato (a); Membrana corada por hematoxilina (b). 41
Figura 10	Placa de ELISA após reação com o kit Og4C3. 42
Figura 11	Apresentação do kit de Og4C3. 42
Figura 12	Alimentação artificial sangüínea de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> . 46
Figura 13	Distribuição dos indivíduos pesquisados por grupos de estudo. 49
Figura 14	Gráfico da Dispersão das densidades de microfilárias no sangue segundo idade. 50
Figura 15	Perfil protéico representativo do extrato de larvas infectantes de <i>W. Bancrofti</i> (AgSE). 52
Figura 16	Percentuais de reconhecimento humoral das proteínas de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> pelos grupos estudados. 53
Figura 17	Proporção de reconhecimento de proteínas de extratos de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> em homens, segundo os grupos de comparação. 55
Figura 18	Proporção de reconhecimento de proteínas de extratos de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> em mulheres, segundo os grupos de comparação. 56
Figura 19	Proporção de reconhecimento das bandas protéicas nos indivíduos portadores de filariose bancroftiana segundo o sexo. 56

Figura 20	Proporção de reconhecimento das bandas protéicas nos indivíduos endêmicos normais segundo o sexo.	57
Figura 21	Proporção de reconhecimento de proteínas de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> nos indivíduos portadores de filariose bancroftiana segundo a faixa etária.	58
Figura 22	Proporção de reconhecimento nos indivíduos endêmicos normais das proteínas pesquisadas segundo a faixa etária.	59
Figura 23	Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> pelo grupo etário de 5 a 12 anos, por grupo de estudo.	60
Figura 24	Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> pelo grupo etário de 13 a 19 anos, por grupo de estudo.	61
Figura 25	Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de <i>W. bancrofti</i> pelo grupo etário acima de 20 anos, por grupo de estudo.	62

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo sexo.	48
Tabela 2	Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo faixa etária.	48
Tabela 3	Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo sexo por faixa etária.	49
Tabela 4	Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo densidade de microfilária e faixa etária.	50
Tabela 5	Distribuição dos grupos estudados segundo sexo e faixa etária.	51
Tabela 6	Distribuição dos indivíduos pesquisados nos grupos de estudo segundo setor censitário de residência.	51
Tabela 7	Relação do reconhecimento de bandas protéicas pelos grupos estudados segundo o sexo.	54
Tabela 8	Regressão logística com o método “ENTER”.	63
Tabela 9	Regressão logística com o método “BACKWARD”.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS -	Agentes Comunitários de Saúde
AgSE -	Antígeno Secretório e Excretório
CDC -	Center Disease Control
CEP -	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DEC -	Dietilcarbamazina
DS -	Distrito Sanitário
EDTA -	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA -	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPT -	Eosinofilia Pulmonary Tropical
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA -	Fundação Nacional de Saúde
GE -	Gota Espessa
GPELF -	Global Programme To Eliminate Lymphatic Filariasis
ICT -	Immunochromatographic Test
IgG -	Imunoglobulina G
KDa -	Kilodaltons
L3 -	Larvas Infectantes
Mab -	Anticorpo Monoclonal
MDA -	Mass Drog Administration
MEV -	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF -	Microfilárias
MS -	Ministério da Saúde
Og4C3 -	<i>Onchocerca gibsoni</i> monoclonal
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PAHO -	Pan American Health Organization
PBS -	Phosphate Buffer Solution
PMSF -	Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride
SDS-PAGE -	Sodium Dodecil Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLCK -	Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone
WHO -	World Health Organization

ANEXOS

Anexo A Artigo como primeiro autor

1. MIRANDA, J. et al. Perfil protéico e reconhecimento antigênico de extratos de larvas infectantes (L3) de *Wuchereria bancrofti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 38 n. 1, p. 27-32, jan./fev. 2005.

Anexo B Artigos como colaborador

1. FREEDMAN, D.O.; Plier, D.A.; de Almeida, A.; **Miranda, J.**; Braga, C.; Maia e Silva, M.C.; Tang, J.; Furtado, A. Biased TCR repertoire in infiltrating lesional T cells in human Bancroftian filariasis. *J Immunol.*, v.1, n.162(3), p.1756-1764, 1999.
2. BRAGA, C.; Ximenes, R.A.A; Albuquerque, M.F.P.M.; Souza, W.V; **Miranda J.**; Brayner. F.; Alves, L.; Silva, L.; Dourado, I. Avaliação de indicador sócio-ambiental utilizado no rastreamento de áreas de transmissão de filariose linfática em espaços urbanos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1211-1218, set./out. 2001.
3. ALVES, L.C.; Brayner, F.; Silva, L.; **Miranda, J.**; Rocha, A.; Peixoto, C.A. Immunocytochemical localization of antigens recognized by asymptomatic microfilaremic patient's antisera in microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Parasitol. Res.*, v.87, p.1050-1055, 2001.
4. FREEDMAN, D.A.; Plier, D.A.; de Almeida, A.B.; de Oliveira, A.L.; **Miranda, J.**; Braga, C. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. *Trop Med Int Health*. v. 6, n.1, p.37-41, 2001.
5. BRAGA, C. , Dourado, I.; Ximenes, R.; **Miranda, J.**; Alexander N. Bancroftian filariasis in an endemic area of Brazil: differences between genders during puberty. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasilia, v. 38 n. 3, p. 224-228, May/Jun. 2005.

Anexo C 6. Parecer do CEP/CPqAM

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE ANEXOS	
APRESENTAÇÃO	
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações gerais	17
1.2. Características biológicas do parasito	20
1.3. Ciclo biológico	21
1.4. O vetor	24
1.5. Manifestações clínicas	25
1.6. Imunidade protetora	30
1.6.1. Imunidade humoral	32
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Desenho do Estudo	37
3.2. Área de estudo	37
3.3. População estudo	38
3.3.1. Conscientização da comunidade	38
3.4. Seleção dos indivíduos e formação dos grupos de estudo	39
3.4.1. Definição de caso	39
3.4.2. Definição de controle	39
3.5. Variável de exposição principal	39
3.5.1. Co-variáveis de estudo	39
3.6. Testes de diagnóstico empregados	40
3.7. Forma esquemática da formação dos grupos de estudo	43
3.8. Coleta de Dados	44
3.9. Tratamento dos pacientes	44
3.10. Obtenção de larvas infectantes em laboratório	44

3.11. Produção de extratos antigênicos	45
3.11.1. Extratos de produtos secretório e excretório (AgSE)	45
3.11.2. Dosagem de proteínas	45
3.12. Reações imunoquímicas	46
3.12.1. Técnica de Western-blot	46
3.12.2. Eletroforese	46
3.13. Análise estatística	47
3.14. Considerações Éticas	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Perfil da amostra	48
4.1.1. Construção dos grupos de estudo	48
4.2. Extrato secretório e excretório – Perfil protéico	52
4.3. Reconhecimento humoral das bandas protéicas	53
4.3.1. Estratificação por sexo	54
4.3.2. Estratificação por faixa etária	58
4.4. Regressão logística	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. ANEXOS	85

APRESENTAÇÃO

A situação epidemiológica da filariose linfática em torno do mundo tem sido divulgada na literatura científica e em boletins de órgãos oficiais, como os da Organização Mundial da Saúde, como preocupante, desde que os valores de prevalência da doença continuam em ascensão. Esse agravo tem sido consequência do desenfreado crescimento populacional em áreas urbanas, principalmente naquelas de extrema carência, onde fatores como a falta de saneamento e adequadas condições de moradia, propiciam a proliferação do mosquito vetor mantendo a endemia, apesar de programas de controle. Em 1997 foi criado pela WHO um programa denominado GPELF (Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis) com o objetivo de unir forças e organizar encontros anuais entre pesquisadores, gestores e profissionais da saúde, visando eliminar a filariose linfática até o ano de 2020.

Em inquéritos epidemiológicos para atualização de dados e identificação de casos de filariose linfática, observa-se usualmente, a existência de indivíduos residentes de áreas endêmicas, expostos à doença pelo convívio com microfilarêmicos e ao vetor, e que a despeito disso, não contraem a doença. Esse grupo tem sido denominado como “endêmicos normais” e tem despertado intenso interesse, sendo objeto de investigação para a elucidação da imunidade protetora.

Alguns aspectos da defesa imunológica do hospedeiro contra alguns tipos de filária tem sido demonstrados em modelos experimentais. No entanto, a forma bancroftiana, a que acomete nossa região, tem o homem como único hospedeiro definitivo. Essa particularidade tem limitado as pesquisas, principalmente por questões éticas, impedindo que se tenha uma completa compreensão do mecanismo da infecção e do desenvolvimento da imunidade protetora.

Contudo, a observação de que somente uma percentagem de pessoas que vivem em áreas endêmicas adquirem a infecção filarial, de que existe um decréscimo idade-dependente na prevalência da infecção em comunidades humanas e com o recente advento da implementação de modelos matemáticos usando dados de filariose, podemos admitir que o desenvolvimento da imunidade protetora em filariose linfática humana pode ser uma realidade.

O trabalho aqui apresentado teve como área de estudo o Município de Olinda-PE, por se tratar de uma região reconhecida como endêmica por estudos epidemiológicos recentemente desenvolvidos na localidade. Em uma primeira etapa, desenvolveu-se um estudo epidemiológico, efetuado por meio de sorteio residências com o objetivo de analisar

a prevalência e a distribuição geográfica da doença no município. Participaram da pesquisa voluntários portadores de microfilaremia e respectivos familiares, residentes do mesmo domicílio, livres da infecção. Construídos os estratos de soros, categorizados por portadores de filariose bancroftiana e endêmicos normais, segundo as variáveis de sexo e idade, na segunda etapa do estudo foram verificadas, através de um estudo do tipo caso-controle, as diferenças no reconhecimento imune humoral de proteínas contidas no produto secretório-excretório de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti*. A técnica imunoquímica, empregada para promover reação antígeno-anticorpo, foi a de *Western-blot*. Os diferentes perfis de reconhecimento de proteínas obtidos foram analisados estatisticamente, evidenciando as proteínas relevantes e as que diferiram significativamente entre os dois grupos de expostos à infecção de filariose linfática bancroftiana.

1. INTRODUÇÃO

1.1. - Considerações gerais

O termo filariose é a denominação genérica para designar a infecção causada por nematóides, no homem ou em outro animal vertebrado (PESSOA; MARTINS, 1982). A existência da filariose linfática é demonstrada por provas arqueológicas em um período que antecede a era cristã em cerca de 2000 anos. Porém, como doença parasitária, só foi reconhecida após a primeira detecção de parasitas embrionários em fluido biológico (líquido hidrocelico) por Jean-Nicolas Demarquay em 1863.

Das espécies distintas de vermes filariais, nove delas parasitam o homem: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella ozzardi*, *Manzonella pertans* e *Dracunculus medinensis* (SASA, 1976; OTTESEN, 1993). Dentre estas filárias, a *W. bancrofti* e *O. volvulus* são parasitos de grande interesse médico e relativamente pouco estudados, dada a inexistência de um modelo experimental.

A filariose linfática bancroftiana persiste como um grave problema de saúde pública nos países tropicais e sub tropicais incluindo o Brasil. As conseqüências da doença podem levar à morbidade clínica, causando infecções, agudas ou crônicas que geralmente refletem a natureza e intensidade da resposta imune do hospedeiro ao parasitismo (KING; NUTMAN, 1991). Em algumas regiões de alta endemicidade, a doença filarial linfática chega a comprometer o desenvolvimento econômico devido à redução da produtividade e, conseqüentemente, reduzindo as oportunidades de vida devido à incapacitação do trabalhador (RAMAIAH et al., 2000). A imobilidade física que atinge alguns portadores da parasitose, associada à estigmatização social e psico-social, pode ser considerada como a característica mais drástica da doença.

Atualmente são encontrados casos de filariose linfática em 83 países distribuídos pelas regiões das Américas Central e do Sul, África Central, Sudeste da Ásia e ilhas do Pacífico Ocidental. Cerca de 120 milhões de pessoas no mundo são portadoras de filariose linfática, sendo 107 milhões (90% dos casos) infectados pela *W. bancrofti*. A bancroftose, além de apresentar o maior número de casos, também é a mais difundida geograficamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; OTTESEN et al., 1997). 12,9 milhões (10% dos casos) são causados por espécies de *Brugia* (COX, 2000). A filariose causada pela *B.*

malayi está confinada ao sudeste e leste da Ásia e a causada pela *B. timori* é encontrada no Timor e em suas ilhas adjacentes.

Aproximadamente 1,1 bilhão de pessoas, cerca de 20% da população mundial, estão expostas ao risco da infecção por viverem em áreas endêmicas.

Na Índia concentra-se o maior número de pessoas infectadas, com aproximadamente 48 milhões de casos que expõem ao risco da infecção 45% da população que vive em áreas endêmicas (DAS, et al., 2001). A África apresenta 40,0 milhões de casos, a Ásia 14,5 milhões (excluindo China e Índia), Ilhas do Pacífico e China com 5,46 milhões de casos. Na América Latina, Caribe e Oriente Médio (região do crescente fértil) são notificadas baixas cargas parasitárias e pouca morbidade, sendo considerada como de importância focal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a filariose linfática como a segunda maior causa de desabilidade física no mundo causada por parasitoses. Em 1993, a Força Tarefa Internacional para Erradicação de Doenças (RECOMMENDATIONS..., 1993) incluiu a filariose linfática no grupo de doenças com potencial de erradicação, considerando que já existem na atualidade, conhecimentos e recursos suficientes para o controle da epidemia. Outras doenças como poliomielite, sarampo, hanseníase, doença de Chagas, dracunculíase e oncocercose, foram também incluídas no grupo de doenças erradicáveis. Desta maneira, foi iniciado um plano global com o objetivo de eliminação desse problema de saúde pública até o ano de 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). O *Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis* (GPELF) está baseado em duas estratégias: interrupção da transmissão e prevenção e alívio de incapacidades associadas à filariose linfática. Segundo a OMS, o sucesso do programa depende em grande parte da administração em massa (MDA) de drogas filaricidas (diethylcarbamazina ou ivermectina, co-administradas com albendazol) as quais possuem eficiência confirmada na redução do número de parasitos na circulação sanguínea para níveis tão baixos que a infecção do mosquito vetor torna-se insignificante e conseqüentemente, interrompe a transmissibilidade.

A OMS avalia os valores de prevalência apresentados em estudos epidemiológicos como preocupantes e considera subestimados os percentuais encontrados quando o teste da gota espessa é empregado como ferramenta diagnóstica. Esse teste ainda é o mais difundido e utilizado em estudos epidemiológicos por apresentar vantagens como baixo custo e grande especificidade, no entanto tem pouca sensibilidade pelo pequeno volume de sangue coletado para o diagnóstico. Além disso, a detecção de parasitos será extremamente prejudicada se a coleta do sangue for realizada em horário não condizente com o período de pico da parasitemia periférica sanguínea (DREYER; MEDEIROS, 1990). Ainda considerando a

subestimação de resultados em estudos epidemiológicos, diante do forte caráter focal na distribuição da filariose bancroftiana, o critério para escolha do método de amostragem também é relevante. A identificação dos grupos de investigação feita através de sorteio, ao acaso, pode não contemplar no inquérito, residências ou setores censitários em aglomerados com significativa carga endêmica.

Essas estimativas sugerem que a prevalência da infecção filarial pode estar crescendo passivamente no mundo de acordo com o crescimento da população humana ou ativamente por causa da urbanização rápida não planejada em muitas áreas endêmicas (ALBUQUERQUE, 1993; MICHAEL; BUNDY; GRENFELL et al, 1996; MICHAEL et al, 2004).

No Brasil, a plenária do Conselho Nacional de Saúde homologou a resolução CNS nº 190, de 13 de junho de 1996, iniciando também o programa de eliminação da filariose linfática (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1997). As cidades de Salvador (BA) e Belém (PA) foram, nos anos cinquenta, as primeiras do país a serem consideradas focos de filariose linfática (FRANCO; SILVA-LIMA, 1967). Entre 1951 e 1958 o Ministério da Saúde realizou inquéritos hemoscópicos e entomológicos identificando os seguintes focos ao longo de sete Estados brasileiros: São José da Ponta Grossa-SC, (14,5%); Belém-PA, (9,8%); Barra de Laguna-SC, (9,4%); Recife-PE, (6,9%); Castro Alves-BA, (5,9%); Florianópolis-SC, (1,4%); São Luis-MA, (0,6%); Salvador-BA, (0,4%); Maceió-AL, (0,3%); Manaus-AM, (0,2%) e Porto Alegre-RS, (0,1%) (RACHOU, 1960; BRAUN, 2002). Na década de 1980, quase todos os focos descritos foram considerados extintos no Brasil, exceto, segundo o Ministério da Saúde, aqueles existentes em Belém (PA) e Recife (PE) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 1985). A cidade de Maceió-AL em 1990, também foi constatada como foco de transmissão ativa de filariose linfática bancroftiana. No Estado de Pernambuco, a Região Metropolitana do Recife, que engloba as cidades de Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista é considerada foco endêmico. Essa região tem sido reconhecida como endêmica de filariose bancroftiana desde os trabalhos realizados por Azevedo; Dobbin, em 1952, ocasião em que foi determinada uma prevalência de 9,7%. Posteriormente, Rachou; Ferreira; Lima, (1954) e Rachou, (1955) realizaram outros inquéritos epidemiológicos encontrando valores de prevalência de 5,6% a 10,9% de acordo com o bairro analisado. Em inquérito realizado por Maciel et al., (1994), encontrou-se uma prevalência média de 6,5% (a maior do Brasil). Em recente relatório da PAHO (Pan American Health Organization) de 2003, a região metropolitana do Recife ainda é considerada como um foco ativo e em expansão. Segundo o inquérito parasitológico realizado entre 1999 e 2000, as áreas de transmissão da doença foram identificadas em cerca

de 52% dos bairros da cidade. O distrito sanitário II (DS II) foi o que concentrou o maior número de áreas endêmicas, tendo os bairros de Água Fria e Alto de Santa Terezinha com prevalência de microfilaremia de 6,2% e 10,4%, respectivamente, atingindo os maiores níveis de endemicidade na cidade (RECIFE, 2002). De acordo com o relatório, o estado de Alagoas apresenta 2,06% de prevalência de microfilaremia e somente o estado do Pará apresenta indícios do controle da doença, apresentando um caso de microfilaremia entre 99.000 investigados. A Região Metropolitana do Recife e Maceió permanecem como focos da endemia, com cerca de 49.000 infectados (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

1.2. - Características biológicas do parasito

O parasito *Wuchereria bancrofti* pertence à classe **Nematoda**; Superordem - **Filarioidea** - Weinland, 1858; Família - Filariidae - Clauss, 1885; Sub-família - **Filariinae** - Stiles, 1907; Gênero - **Wuchereria** - Silva Araújo, 1877; Espécie - *Wuchereria bancrofti* - Cobbold, 1877; da Silva Araújo, 1877.

A *Wuchereria bancrofti*, como parasito heteroxênico, apresenta dentro de seu ciclo evolutivo um estágio de maturação no hospedeiro invertebrado e outro no hospedeiro definitivo, o homem, onde completa seu desenvolvimento atingindo maturidade sexual e reprodutiva. O verme em sua fase adulta apresenta um corpo cilíndrico, fino, branco translúcido e recoberto por uma delicada cutícula (LACERDA; TAVARES; DOURADO, 1983). O macho de menor tamanho (25 - 40 mm) apresenta na região posterior curvatura ventral com dois espículos visíveis. A fêmea apresenta 50-100 mm de comprimento, possui dois tubos uterinos que ocupam grande parte do corpo, os ovos são observados na porção mais posterior, enquanto que os embriões, microfilárias imaturas, se localizam próximo da vagina, na região anterior do corpo (KOURI; BASNUEVO, 1949).

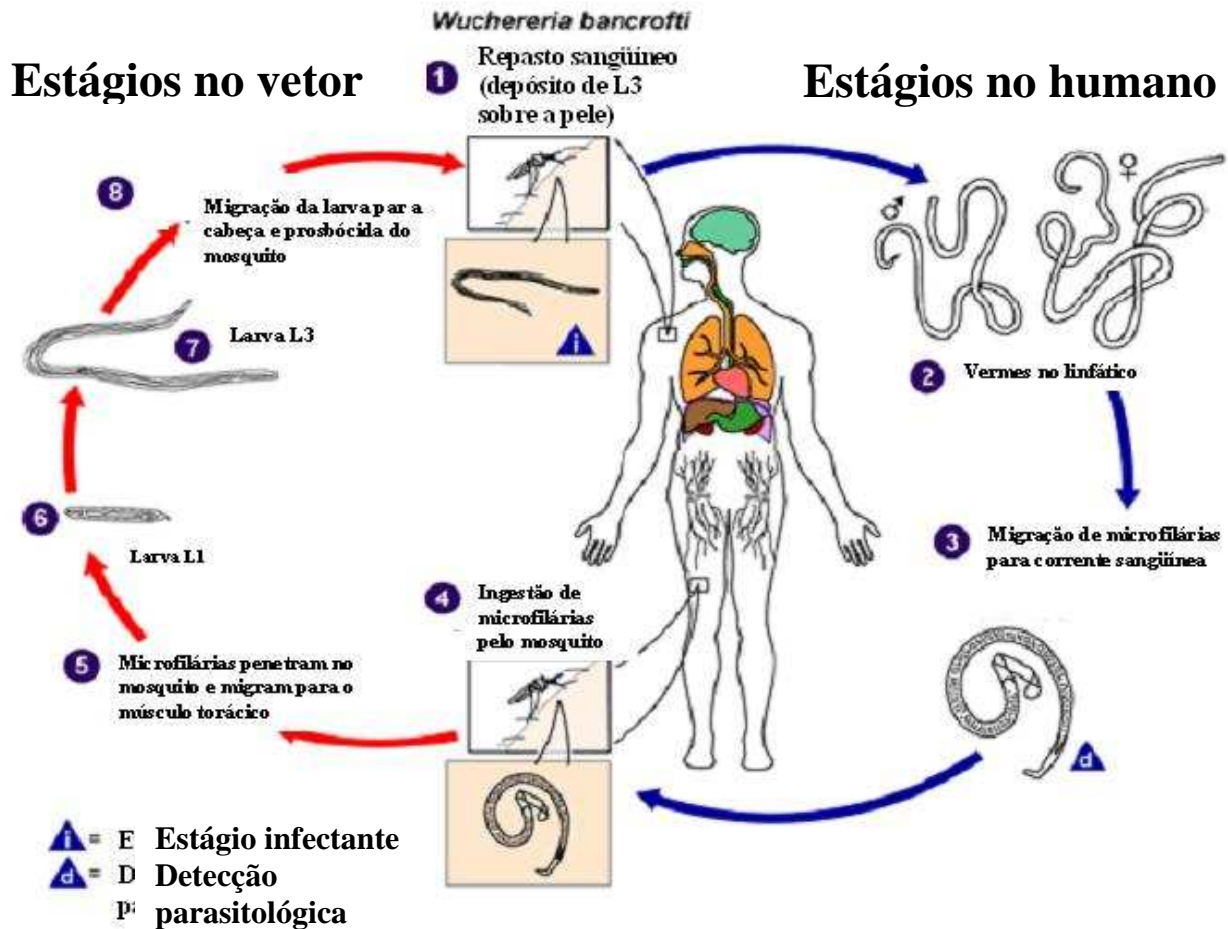
As microfilárias, encontradas na circulação sanguínea, medem de 250 a 300 µm, possuem uma delicada membrana ovular, que após distendida, passa a constituir a bainha da microfilária (REY, 2002). Ao exame microscópico, nas microfilárias fixadas e coradas por hematoxilina ou Giemsa, observa-se além da bainha, núcleos que são correspondentes a células subcuticulares que irão formar a epiderme e a musculatura do helminto adulto e as células somáticas que irão constituir o tubo digestivo e outros órgãos. Alguns espaços sem núcleos correspondem a outras estruturas em formação como anel nervoso, poro e célula

excretora. Na região caudal, encontra-se uma série de núcleos ou “células germinativas” que participarão da formação posterior do aparelho genital (REY, 2002)

1.3.- Ciclo biológico

Todos os parasitas filariais possuem um ciclo de vida similar e empregam artrópodes como hospedeiros intermediários, exceto *Dracunculus medinensis*. O ciclo biológico pode ser descrito a partir de quando ocorre a penetração da larva infectante (L3), após ter sido depositada pelo mosquito sobre a pele do indivíduo no ato da hematofagia (Figura 1). Esta larva migra através da circulação sanguínea e se instala nos vasos linfáticos ou linfonodos, onde realiza duas mudas atingindo a fase adulta. As fêmeas adultas, por reprodução sexuada, liberam grande quantidade de embriões denominados microfíliarias. Esta forma evolutiva apresenta um ritmo circadiano na circulação sanguínea, sendo encontrada nos vasos periféricos principalmente no período noturno, com horário de pico de 23:00 a 1:00h (DREYER; MEDEIROS, 1990). No período diurno as microfíliarias acumulam-se no interior da rede vascular sanguínea dos pulmões. Em algumas regiões endêmicas do mundo a detecção de microfíliarias no sangue periférico pode acontecer em períodos diurnos (periódica diurna) ou a qualquer horário (aperiódica).

As microfíliarias ao serem ingeridas pelo mosquito vetor, chegam ao intestino médio do mosquito, perdem a bainha e atravessam o epitélio intestinal atingindo a hemocele. Migram para o interior das células musculares do tórax, onde passam por dois estádios de desenvolvimento morfológicamente distintos até atingirem a fase de larva infectante (Figura 2a; 2b). Esta forma larvar é dotada de uma movimentação intensa e pode ser localizada tanto na cabeça, tórax ou abdome do mosquito (PAILY et al., 1995).



Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis_il.asp?body=A-F/Filariasis/body_Filariasis_il_th.htm

Figura 1 – Ciclo biológico da *Wuchereria bancrofti*. O mosquito infectado deposita larvas do terceiro estágio (L3) sob a pele do hospedeiro humano, as larvas penetram no organismo humano provavelmente pela mesma inserção feita pela picada 1. As larvas alcançam os vasos e nódulos dos linfáticos, realizam mudas e tornam-se adultas 2. Os vermes fêmeas medem em torno de 80 a 100 mm de tamanho e 0.24 a 0.30 mm de diâmetro e os machos medem cerca de 40 mm de comprimento e 0.1 mm de diâmetro. As microfílarias medem aproximadamente 244 a 296 µm por 7.5 a 10 µm. As microfílarias migram através da linfa e canais sanguíneos movendo-se ativamente 3. Os mosquitos ingerem as microfílarias durante o repasto sanguíneo 4. Após a ingestão, as microfílarias perdem a bainha e algumas conseguem alcançar a parede do proventrículo e a porção cardíaca do intestino médio do mosquito e músculos torácicos 5. Primeiro estágio larvar 6. Desenvolvimento da larva de terceiro estágio 7. Larva infectante com movimento intenso e próxima a probóscida do mosquito 8. Realização de novo repasto sanguíneo e infecção.

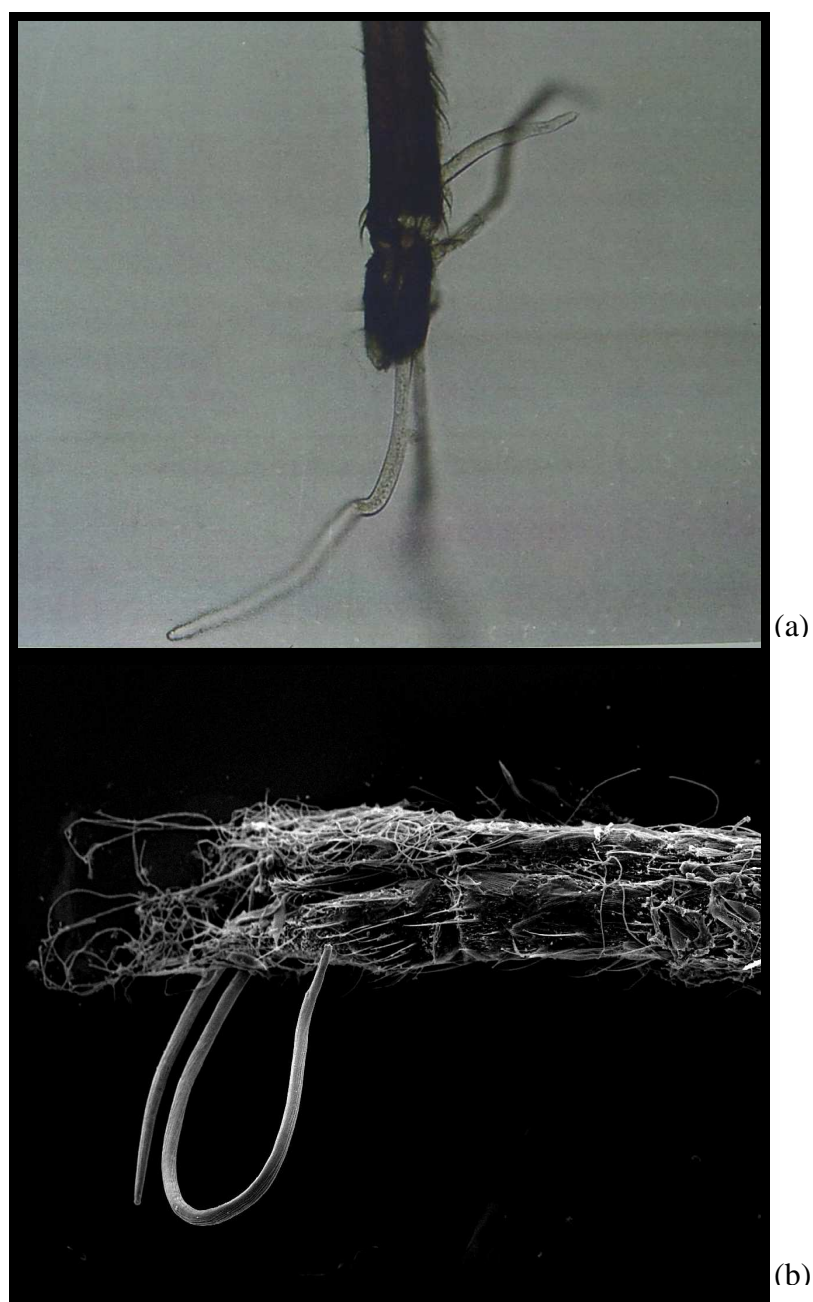


Figura 2 - Larva infectante (L3) sendo liberada pela probóscida do *Culex quinquefasciatus*. (a) Microscopia óptica (40x); (b) Microfotografia em MEV.

1.4.- O vetor

Dependendo da região geográfica são também considerados como vetores da *W. bancrofti* vários gêneros de mosquitos: *Culex* (*Cx. annulirostris*, *Cx. bitaeniorhynchus*, *Cx. quinquefasciatus*, e *Cx. pipiens*); *Anopheles* (*An. arabinensis*, *An. bancroftii*, *An. farauti*, *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. koliensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. punctulatus* e *An. wellcomei*); *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. aquasalis*, *Ae. bellator*, *Ae. cooki*, *Ae. darlingi*, *Ae. kochi*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. pseudoscutellaris*, *Ae. rotumae*, *Ae. scapularis*, e *Ae. vigilax*); *Mansonia* (*Ma. pseudotitillans* e *Ma. uniformis*); *Coquillettidia* (*Cq. juxtamansonia*). O *Culex quinquefasciatus* é um vetor natural da *W. bancrofti*, tendo atingido na escala evolutiva um alto grau adaptativo fisiológico diante da relação parasito-hospedeiro (LIMA et al., 2003). Esse vetor tem sua presença notificada em várias partes do mundo, principalmente nos trópicos e sua distribuição e abundância estão fortemente influenciadas pela presença do homem (FORATTINI et al., 1993). No Brasil, este mosquito é altamente difundido e se constitui o principal vetor da filariose bancroftiana. De acordo com Consoli; Oliveira, (1994), os focos de *W. bancrofti* estão relacionados com a existência e a densidade populacional do *Culex*. As fêmeas dessa espécie são hematófagas, endofílicas, e preferencialmente antropofílicas, o que justifica uma maior concentração desses mosquitos nas áreas urbanas onde se estabelecem aglomerados humanos e na Região do Grande Recife, a alta contingência desse vetor está diretamente relacionada a um somatório de condições climáticas e ambientais favoráveis à sua proliferação (OLIVEIRA, 1996). O processo desordenado de urbanização, precárias condições sanitárias ou mesmo a ausência delas (ALBUQUERQUE, 1993) são fatores que associados à disposição geográfica e topográfica de nossa região, propiciam a formação de criadouros permanentes e temporários desse mosquito pelo acúmulo de águas fluviais e pluviais, geralmente enriquecidas organicamente.

A proximidade de criadouros no peridomicílio, bem como as condições intradomiciliares como pouca luminosidade, elevada umidade e um grande número de indivíduos por moradia, contribuem para que haja uma pequena dispersão do vetor e assim intensifica a transmissão da parasitose, reforçando o caráter focal da doença filarial (OLIVEIRA, 1996).



Figura 3 - *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da filariose bancroftiana no Brasil, em hematofagia.

1.5.-Manifestações clínicas

A filariose bancroftiana apresenta um amplo espectro em suas manifestações clínicas. Essa diversificação pode estar associada, entre outros fatores, ao estágio do parasita no hospedeiro, ao número de vermes adultos, à sua localização no sistema linfático e à resposta imunológica apresentada pelo indivíduo parasitado (SELKIRK et al.,1986). A heterogeneidade de respostas à infecção é considerada uma forte característica da doença e representa um complicador na análise de sua dinâmica nas populações endêmicas.

Os residentes de área endêmica são categorizados em grupos distintos de fenótipos clínicos. As formas clínicas e sua patogênese foram descritas por Ottesen et al., (1992) e WORLD HEALTH ORGANIZATION, (1992) nas seguintes categorias:

- a. Microfilarêmicos assintomáticos - Estes indivíduos apresentam parasitemia detectável, porém não apresentam manifestações clínicas e podem permanecer assim por anos. Casos de anormalidades renais (hematúria microscópica) e ou proteinúria podem ser formas clínicas silenciosas em microfilarêmicos. Alguns apresentam sintomas logo após se tornarem amicrofilarêmicos.
- b. Hipersensitivos à reação parasitária (Eosinofilia pulmonar tropical – EPT) Patologia menos comum e nem sempre relacionada a danos linfáticos (OTTESEN, 1993). EPT tem seu quadro clínico caracterizado por tosses noturnas e sintomas de bronquite asmátiforme. Indivíduos que apresentam EPT são geralmente amicrofilarêmicos e apresentam altos níveis de eosinófilos ($> 3000/\text{mm}^3$), IgG, IgG4 e IgE. Associa-se a elevação das taxas de imunoglobulina à morte de microfilárias nos pulmões, ocasionando uma grande liberação de

antígenos, causando processo inflamatório e alérgico broncopulmonar (NUTMAN, 1989). Infecções como ascaridíase e estrogiloidíase, enquanto no ciclo pulmonar, (Síndrome de Loeffler) apresentam similaridade com este quadro clínico (ROCHA et al., 1995).

c. Crônicos com seqüelas da infecção incluindo linfedema, hidrocele e elefantíase. A elefantíase representa a forma mais evidente de manifestação crônica, sendo os membros inferiores as partes do corpo mais atingidas. É desenvolvido pelo acúmulo de fluido de linfa nos tecidos, danificando os vasos linfáticos. A primeira evidência de elefantíase iminente consiste na persistência do linfedema, o que causa na pele infiltração fibrosa, desidratação e aspereza. A formação de fissuras e úlceras na pele, comumente vistas em pacientes com elefantíase, são resultantes das alterações na camada subcutânea e nos tecidos conjuntivos fibrosos, adiposos e granulomatosos (BURRI et al., 1996). Nessa situação torna-se altamente vulnerável o acesso de bactérias e fungos. Essas infecções secundárias agravam o comprometimento da função linfática provocando episódios de adenolinfangites causando ou exacerbando modificações crônicas obstrutivas nos linfáticos. Adenopatia, hidrocele (em homens), quiloccele, linfoescroto e quilúria são outras formas de manifestações crônicas encontradas em portadores de filariose (Figura 4 a; 4 b).

d. Inflamação linfática aguda: Linfangites (inflamação dos vasos linfáticos) e episódios de adenolinfangites, acompanhada de dor e febre, (geralmente, indivíduos que apresentam adenolinfangites são amicrofilarêmicos) (Figura 5).

e. Endêmicos normais (assintomáticos e amicrofilarêmicos): são grupos que a despeito da longa e constante exposição à infecção, permanecem resistentes a se tornarem portadores de filariose linfática. Esses indivíduos não apresentam qualquer queixa compatível com a sintomatologia apresentada pela doença e são negativos nos testes diagnósticos, tanto por métodos para detecção de microfílarías quanto pelos métodos de alta sensibilidade como os de captura de antígenos (OTTESEN, 1989; WEIL et al., 1996).

David Freedman em 1998, propôs uma nova classificação para as formas clínicas apresentadas pela filariose linfática, considerando defasada as classificações baseadas na presença ou ausência de microfilaremia ou patologia crônica evidente. A classificação proposta distingue os residentes de área endêmica com filariose evidente, infecção ativa e positivos em testes de captura de antígeno (antígeno positivo), dos indivíduos que têm filariose evidente, sem infecção ativa e negativos em testes de captura de antígeno (antígeno negativo). A filariose evidente é definida pelo autor como quaisquer das manifestações clínicas associadas com o espectro clínico conhecido de filariose: adenolinfangite, hidrocele ou elefantíase. Essa proposta de classificação leva em consideração as ferramentas de

diagnóstico baseadas em captura de antígeno circulante (WEIL et al., 1987; MORE; COPEMAN, 1990).

Categorizar grupos residentes de área endêmica como verdadeiramente livres da infecção exige uma acurada triagem por testes de diagnóstico com uma total fidelidade na detecção parasitária. A falta de critérios na classificação desse grupo pode considerar erroneamente, possuidor, do que alguns autores denominam “infecção oculta” (KAZURA et al., 1993; WEIL et al., 1996). Em trabalhos realizados por Dreyer et al., 1996; Norões et al., 1996; Simonsen; Niemann; Meyrowitsch, 1997; e Suresh et al., 1997, é advertido que muitos homens podem estar na fase pré-patente da infecção tendo vermes adultos alojados na região escrotal, e estes só serão identificados por visualização ao exame de ultrasonografia.

A frase expressada por Day; Gregory; Maizels, (1991) que diz "se você olhar cuidadosamente em qualquer população infectada, o endêmico normal é um indivíduo raro" tem sido aceita por diversos outros autores que buscam nesse grupo uma elucidação para a questão da imunidade protetora em residentes de área endêmica de filariose linfática.

Observa-se em alguns trabalhos que a prevalência de endêmicos normais é altamente variável em diferentes áreas geográficas. Em várias áreas de Papua Nova Guiné a intensidade de transmissão é muito alta, resultando na quase totalidade da população infectada, nessa situação, endêmicos normais podem ser até inexistentes (KING, 2000). Por outro lado, outros autores já associam o desenvolvimento da imunidade protetora à intensidade de transmissão e à alta taxa de picadas do vetor infectado (RAVINDRAN et al., 2002).

As diferenças na expressão da doença são percebidas também de acordo com a localidade endêmica, principalmente quanto às conseqüências crônicas da parasitose. Na África, especialmente na Tanzânia, existe uma maior prevalência de casos de hidrocele comparados a outras formas clínicas como linfedema e elefantíase (PARTONO, 1987). Em outras áreas do mundo, como na Índia, casos de hidrocele e linfedema são vistos com a mesma freqüência. As síndromes de Eosinofilia Pulmonar Tropical (EPT) e quilúria, só são notificadas em algumas partes do mundo. O EPT tem sua freqüência mais comum no subcontinente indiano, no Brasil e na Malásia (KUMARASWAMI, 2000). A filariose bancroftiana é definida como uma parasitose com grandes taxas de morbidade e com casos raros de mortalidade, sendo afetados, principalmente, indivíduos com baixo poder socioeconômico de todas as idades e de ambos os sexos (COX, 2000). As infecções filariais linfáticas podem ser adquiridas ainda na infância, e os sinais e sintomas da doença se

tornarem evidentes somente após anos, o que faz com que essa parasitose ainda seja considerada enigmática pelos estudiosos no assunto.



(a)

(b)

Figura 4 - Forma crônica. Indivíduo apresentando hidrocele volumosa bilateral (a); Linfedema bilateral com nodulações vegetativas (b). (Fotos originais do Dr. Abraham Rocha, Serviço de Referência Nacional em Filariose/CPqAM).



Figura 5 – Forma Aguda. Linfangite filarial, em membro inferior. As setas mostram o sentido e o trajeto descendente da reação no quarto dia da evolução (Foto original do Dr. Abraham Rocha, Serviço de Referência Nacional em Filariose/CPqAM).

1.6.-Imunidade protetora

Confirmar a hipótese da existência da imunidade protetora em filariose linfática tem sido objeto de interesse de pesquisadores, que buscam essa informação nas respostas imunes humanas, expressadas por grupos residentes de área endêmica. Acredita-se que a exposição de indivíduos a larvas infectantes possa estimular a uma imunidade protetora; contudo, não existe ainda um claro entendimento que explique uma natural imunidade protetora nas populações expostas à infecção filarial (BAILEY et al., 1995). Trabalhos realizados em diversas partes do mundo inclusive na Índia, Brasil, Cook Islands, Haiti, Indonésia, e Papua Nova Guiné (ALMEIDA; FREEDMAN, 1999; KING, 2000; MAIZELS; LAWRENCE, 1991; NUTMAN, 2001), analisaram as respostas imunes para as várias fases de desenvolvimento do parasita filarial no hospedeiro. No entanto, os resultados encontrados são considerados pelos próprios autores como evasivos, sem concluir, até o momento, a que fatores está associado a imunidade protetora nessas populações.

Em comunidades de áreas de alta prevalência filarial foi demonstrado que as taxas de microfilaremia aumentam proporcionalmente com a intensidade de transmissão, apresentando após um período, uma moderação, gerada provavelmente, pela imunidade da população (MICHAEL et al., 2001). Isto apóia a visão de que a imunidade adquirida em filariose humana pode ser induzida pela exposição, sendo significativa em áreas onde a transmissão é alta (RAVINDRAN et al., 2002). Evidências epidemiológicas sugerem que a prevalência de microfilaremia apresenta um pico em torno dos 20 anos de idade, quando então declina ou se estabiliza em grupos acima desta idade (VANAMAIL et al., 1989; RAJAGOPALAN et al., 1989). Se a exposição é relativamente constante ao longo da vida, então o declínio da prevalência ou a diminuição da intensidade de infecção, em indivíduos de faixa etária mais elevada, pode indicar uma imunidade adquirida contra larvas infectantes. No entanto, não está totalmente claro que a resposta imune protetora esteja associada unicamente ao desenvolvimento da imunidade adquirida em áreas de alta transmissão. Em pesquisas realizadas em Papua Nova Guiné, foram demonstradas respostas de citocinas do tipo Th-2 significativamente mais fortes em uma área de alta transmissão mas a mesma expressão não foi observada em áreas onde a transmissão era considerada baixa (KING, 2000).

Estudos comparativos obtidos através da reatividade imunológica procuram encontrar relações entre o perfil imunológico, estado clínico e infecção em indivíduos com linfedema/elefantíase e indivíduos assintomáticos de mesma área endêmica (NUTMAN et al., 1987; OTTESEN, 1992; KING et al., 1993; YAZDANBAKHSH et al., 1995;

ALMEIDA et al., 1996, 1999; DIMOCK; EBERHARD; LAMMIE, 1996; MAHANTY et al., 1996; STEEL; GUINEA; OTTESEN, 1996 e KURNIAWAN et al., 1998). Esses estudos mostram que em microfilarêmicos a resposta imune apresenta níveis altos do tipo Th-2 para antígenos filariais (MAIZELS; LAWRENCE, 1991). Por outro lado, portadores de forma crônica com linfedema, os quais são freqüentemente amicrofilarêmicos, sempre apresentam alta atividade proliferativa de células T, baixos níveis de interleucina (IL-10) e elevada secreção de citocinas pro-inflamatórias como INF γ , IL2, granulócitos e macrófagos.

Almeida e colaboradores (1999), encontraram níveis mais altos de IL-4 em indivíduos com linfedema do que em indivíduos microfilarêmicos assintomáticos. Outros estudos não acharam diferenças nos níveis de produção de IL-4 e IL-5 assim como também no número de linfócitos que secretam IL-4 entre os pacientes com linfedema e indivíduos microfilarêmicos assintomáticos (KING et al., 1993; MAHANTY et al., 1996). Baseado nessas informações verifica-se que em microfilarêmicos tanto em humanos quanto em animais de experimentação a resposta imune do tipo Th-1 é inibida enquanto a do tipo Th-2 parece ser estimulada. Os microfilarêmicos produzem uma grande quantidade de IL-4 e IL-5 (citocinas do tipo 2) e pequenas quantidades de interferon γ (citocinas do tipo 1) e essa situação é invertida em portadores da doença na fase crônica com elefantíase (Nutman et al., 1987; Maizels e Lawrence, 1991; Ottesen, 1992; Yazdanbakhsh et al., 1993; Dimock et al., 1996; Mahanty et al., 1996). O perfil de citocinas mostra-se ser influenciado não só pelo estado clínico, mas também pela idade do indivíduo parasitado (ALMEIDA et al., 1996; SARTONO et al., 1997). Em microfilarêmicos, a produção IL-4 é mais alta em indivíduos jovens, decrescendo com o aumento da idade. Contrariamente, a produção de interferon γ aumenta com idade em amicrofilarêmicos, mas não em microfilarêmicos, assim como aumentam também os níveis de IL-5 para ambos os grupos (SARTONO et al., 1997). Essa resposta antiinflamatória e antiproliferativa parece influenciar na sobrevivência do parasito assim como na proteção quanto à destruição tecidual do hospedeiro, que pode ocorrer devido a uma resposta inflamatória aguda (GILLAN; DEVANEY, 2005).

A presença de populações T regulatórias tem sido associada com a infecção ativa causada pelo parasito adulto e ou microfíliarias o que concorda com o conceito de que essas células são importantes na resposta da regulação imune nas condições da doença crônica. A complexidade desse trama imune regulatório são bem exemplificados por estudos em modelos murinos para outras infecções parasitárias. Por exemplo, em parasitoses como leishmaniose e malária, nas quais as células T regulatórias são requeridas para a persistência

do baixo nível parasitário, o que é essencial para a manutenção da imunidade (BELKAID et al., 2002; HISAEDA et al., 2004).

1.6.1 Imunidade Humoral

Os anticorpos são caracteristicamente induzidos em muitos processos de infecções parasitárias. As classes e subclasses de anticorpos são respostas instrumentais porque cada isotipo tem uma função biológica distinta. Conhecer a resposta humoral que o indivíduo infectado desenvolve ao longo da parasitose pode ser a grande chance para esclarecer a complexidade da infecção e, desta maneira, encontrar novos caminhos para o controle da doença (SEMNANI; NUTMAN, 2004). As infecções filariais produzem uma resposta humoral policlonal ativa com a produção de anticorpos IgG, IgM e IgE (OTTESEN, 1984; NUTMAN et al., 1987; NANDURI; KAZURA, 1989). Em microfilarêmicos esses títulos apresentam-se em níveis mais baixos comparados aos encontrados em portadores de formas crônicas, enquanto que os indivíduos que desenvolvem a síndrome EPT expressam os maiores títulos dessas imunoglobulinas (OTTESEN, 1989; ADDISS et al., 1995; OTTESEN, 1992; ESTAMBALE, et al., 1995). Anticorpos contra microfilárias estão normalmente ausentes em microfilarêmicos e em experimentos *in vitro* os linfócitos isolados de microfilarêmicos não são capazes de produzir anticorpos filaria-específicos.

A produção dos isotipos de IgG diferem de acordo com a manifestação da doença. Em microfilarêmicos, uma grande proporção de IgG consiste em IgG4 (até 90%) e há baixos níveis de IgG1, IgG2 e IgG3. Por sua vez, os portadores de elefantíase apresentam títulos mais baixos do anticorpo antifilarial IgG4 do que os microfilarêmicos, e apresentam freqüentemente aumento nos níveis de IgG2 e IgG3 (SUTANTO, 1985; HUSSAIN; GROGL; OTTESEN, 1987; KWAN-LIM; FORSYTH, 1990; OTTESEN, 1992; EGWANG et al., 1993; KURNIAWAN et al., 1993; LAMMIE et al., 1993; MAIZELS; DENHAM; YAZDANBAKHSI et al., 1993; YAZDANBAKHSI et al., 1993; ADDISS et al., 1995; NICOLAS, et al., 1999). Esses estudos também confirmam que nos residentes de área endêmica, independentemente da fase clínica do portador de filariose linfática, os níveis de anticorpos para a maioria dos isotipos tendem a ser mais altos na faixa etária mais jovem. É provável que a elevação dos níveis de IgG2 e IgG3 contribuam para a patologia de elefantíase, promovendo reações de hipersensibilidade celular ou formação de complexos imunes (MAIZELS et al., 1995).

Em portadores de patologia filarial crônica foram observados níveis significativamente mais altos de complexos imunes do que em microfilarêmicos ou em

endêmicos normais (PRASAD; REDDY; HARINATH, 1983). As diferenças em isotipos de IgG perfilam em grupos com manifestações diferentes de filariose. Essa constatação foi demonstrada em estudos de vários países incluindo: Índia (HUSSAIN; GROGL; OTTESEN, 1987), Papua-Nova Guiné (KWAN-LIM; FORSYTH; MAIZELS, 1990), Gabão (EGWANG et al., 1993), Haiti (LAMMIE et al., 1993), Malásia (RAHMAH et al., 1994), Ilhas do Sul do Pacífico (CHANTEAU, et al., 1991; 1995) e Tanzânia (SIMONSEN et al., 1996). Deve-se ressaltar que na maioria dos estudos de anticorpos filariais foram utilizados antígenos brutos preparados de vermes adultos de *B. malayi* ou de *B. pahangi*.

Ao contrário do que se espera para vermes adultos, larvas infectantes representam um importante alvo para o estudo da imunidade em filariose (HELMY et al., 2000). Animais experimentais que foram imunizados com larvas irradiadas mostraram uma significativa imunidade ao serem desafiados pela infecção (YATES; HIGASHI, 1985; WEIL et al., 1992). A busca pelo alvo antigênico e mecanismo da imunidade em filariose animal são áreas de intenso estudo. Animais vacinados produzem fortes respostas para superfície de L3 e também para antígenos somáticos (YATES; HIGASHI, 1985; WEIL et al., 1992). Outros estudos têm mostrado que a imunização com antígenos definidos de L3 ou a transferência passiva de anticorpos para L3 podem conferir significativa imunidade para filariose em alguns modelos animais (HARTMANN et al., 1997).

A avaliação das respostas de anticorpos a extratos antigênicos produzidos com larvas infectantes de *B. pahangi*, foi feita por Bailey et al., (1995) e Day; Gregory; Maizels, (1991) em estudos com populações endêmicas de filariose bancroftiana. A forma evolutiva de maior importância para se entender as relações imunológicas entre parasito e hospedeiro é a de larvas de terceiro estágio. Elas representam a forma com que se dissemina a parasitose, promovendo conseqüentemente, o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro. No entanto, pouco se conhece sobre suas características biológicas, antigênicas, e aspectos moleculares e sobre a relação entre hospedeiro-parasito que se estabelece entre o homem infectado e a *W. bancrofti*.

A larva infectante pode ser considerada como a forma evolutiva mais vulnerável do parasita no hospedeiro. Em curto espaço de tempo a larva sofre bruscas mudanças de meio, requerendo uma pronta adaptação ao ser depositada sob a pele do hospedeiro após ser liberada pelo vetor e, em seguida, uma nova adaptação é necessária ao invadir o organismo do hospedeiro, permeando, por seu tropismo característico, através do tecido subcutâneo para o mais próximo dos vasos linfáticos. A larva possui exigências biológicas para um metabolismo rápido. Cresce em tamanho, atingindo cerca 2000 µm e desenvolve seu processo de muda dentro de aproximadamente 10-12 dias para a próxima fase larvar (L4).

Na falta de um modelo animal experimental para *W. bancrofti*, a maioria das informações sobre a ação de larvas infectantes em seus hospedeiros mamíferos, referem-se a outras espécies de filárias como *B. malayi* e *B. pahangi*.

Muitos esforços têm sido empenhados para o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos e possivelmente de vacinas com o objetivo de detectar e eliminar a *W. bancrofti*. O grande impedimento encontrado para uma maior eficiência nos resultados dessas pesquisas deve-se à falta de modelos animais, embora em primatas como *Presbytis cristatus* existam alguns resultados de desenvolvimento de filariose (PALMIERI, et al., 1982), ou de sistemas de cultura especiais, que sejam capazes de manter o parasito “*in vitro*” por determinado tempo. Apesar dessas dificuldades, a identificação de reações cruzadas entre antígenos de nematóides tem sido explorada para desenvolver testes sorológicos para estudos epidemiológicos como também para o isolamento e caracterização de antígenos recombinantes (BURKOT; KWAN-LIM; MAIZELS, 1996).

A caracterização de antígenos de L3 é particularmente importante, desde que esta é a fase infecciosa para humanos. Alguns estudos epidemiológicos de corte transversal têm sugerido que a resistência adquirida por alguns residentes de área endêmica não está dirigida ao verme adulto e sim, provavelmente, ao estágio infectante (DAY et al., 1990; DAY; GREGORY; MAIZELS, 1991). No objetivo de desenvolvimento de uma potencial vacina, a identificação de antígenos de larvas infectantes espécie-específico deverá contribuir sensivelmente tanto para aplicações epidemiológicas, quanto para definir a exposição de populações às picadas de mosquitos infectados. Além disso, poder-se-ia identificar mosquitos infectados com a larva, através de reações com anticorpo monoclonal espécie-específico (MAb) por imunoenaios dirigidos contra tais antígenos.

Um grupo de especial interesse para o estudo da imunidade protetora tem sido reservado aos “endêmicos normais”. Como descrito anteriormente, essa denominação tem sido atribuída aos indivíduos residentes em área endêmica, portanto, exposto à infecção, que não apresentam microfilaremia, antigenemia circulante, ou qualquer outra sintomatologia da filariose linfática.

Em nosso trabalho objetivamos verificar através de um estudo do tipo caso–controle, (que por definição trata-se de um estudo epidemiológico no qual se busca aferir uma associação entre um determinado fator de risco ou proteção e a ocorrência de uma determinada doença, em grupos selecionados a partir da presença ou ausência da doença em questão) quais as diferenças no perfil de reconhecimento humoral entre grupos de microfilarêmicos e endêmicos normais de uma reconhecida área endêmica para filariose bancroftiana no Município de Olinda-PE. Tivemos como base para o estudo um prévio

inquérito epidemiológico realizado na área, onde foi verificada a prevalência da doença e a localização dos sujeitos para formação dos grupos de estudo. Desta maneira, ao término do trabalho, esperamos contribuir na demonstração da importância dos antígenos parasitários na indução de proteção, apontando proteínas da composição de extratos de larvas infectantes que possam ser consideradas imunologicamente relevantes e que possam gerar investigações posteriores mais aprofundadas na caracterização e desenvolvimento de novos testes diagnósticos ou mesmo vislumbrar a possibilidade de vacinas.

2. OBJETIVOS:

2.1 Geral:

Estudar o perfil da resposta imune humoral específica para antígenos de larva infectante (L3) de *Wuchereria bancrofti* em indivíduos residentes em área endêmica livres da infecção e de portadores da doença filarial.

2.2 Específicos:

- Comparar a frequência de reconhecimento imunológico (IgG específica) de bandas protéicas do extrato de larvas infectantes de *W. bancrofti*, entre portadores e não portadores da doença filarial.
- Verificar a associação entre variáveis idade e sexo, com a resposta de anticorpos a antígenos de larvas infectantes.
- Verificar a resposta imune humoral dos indivíduos endêmicos normais às proteínas secretórias e excretórias de larvas infectantes de *W. bancrofti* como um fator de proteção à doença filarial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo:

Estudo do tipo caso-controle.

3.2 Área de estudo

O estudo foi realizado no Município de Olinda-PE, em uma área que apresentou a maior agregação espacial de casos de microfilaremia, de acordo com os resultados de um estudo de prevalência realizado no período de 1999 a 2000 (BRAGA et al., 2001) (Figura 6). Nessa área, situada na interseção dos bairros de Águas Compridas, Alto da Conquista e Sapucaia e que corresponde a 4 setores censitários (181, 179, 173 e 178), realizou-se, em 2000, um segundo inquérito porta a porta, no qual foram cadastrados 972 domicílios e examinados 5259 moradores, tendo-se identificado 317 (6%) indivíduos microfilarêmicos.

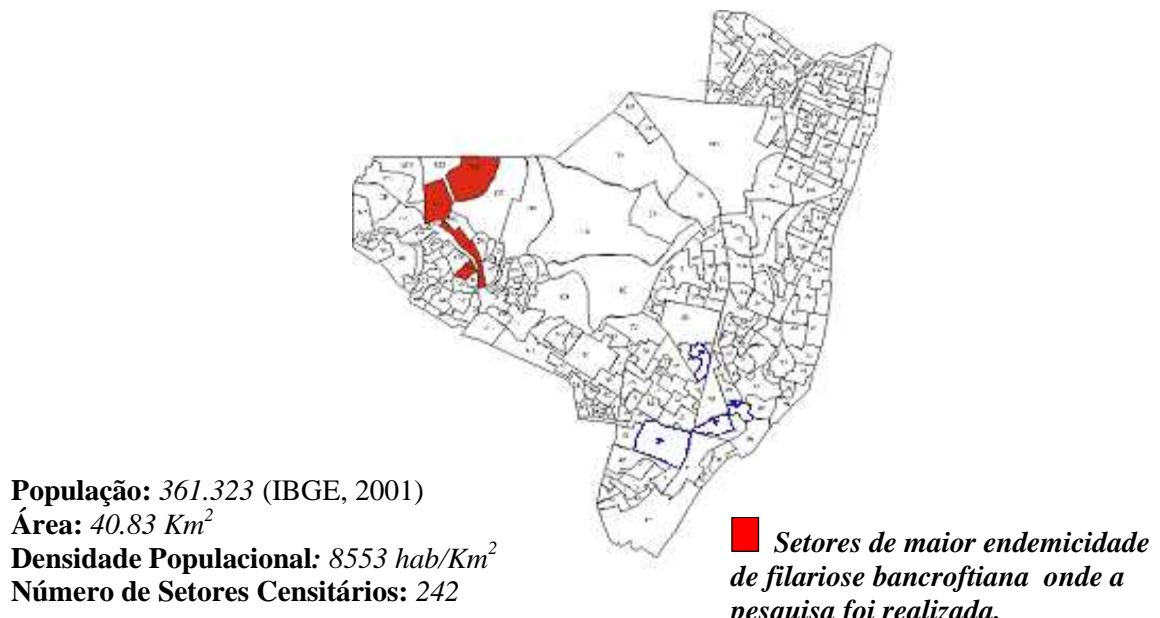


Figura 6 - Mapa do Município de Olinda-PE com divisão por setores censitários (IBGE)

3.3 População de estudo

Foram alvo do presente estudo indivíduos que participaram do inquérito porta a porta, de ambos os sexos, com idade a partir de 5 anos.

3.3.1 Conscientização da Comunidade

Foram realizadas visitas aos domicílios selecionados e proferidas palestras nos Centros Comunitários nos horários diurno e noturno. Os participantes obtiveram esclarecimentos sobre a doença, formas de transmissão, reconhecimento de focos do vetor, tratamento e sobre a importância da pesquisa a ser realizada. Profissionais da Saúde e Agentes Comunitários de Saúde (ACS) da Prefeitura de Olinda colaboraram na forma da divulgação e nas apresentações dos eventos.



Figura 7 - Vista panorâmica do Bairro de Águas Compridas, Olinda-PE (área endêmica de filariose bancroftiana). Foto original de Sérgio Santos.

3.4 Seleção dos indivíduos e formação dos grupos de estudo

Foi estudada uma amostra por conveniência dos domicílios nos quais se identificou indivíduos microfilarêmicos identificados no inquérito porta a porta. O ponto de partida para formação dos grupos foi a identificação de indivíduos livres de infecção que residiam no mesmo domicílio no qual se identificou um ou mais casos de microfilaremia.

3.4.1 Definição de caso:

- Indivíduo negativo pelos testes da gota espessa, filtração através de membrana de policarbonato e pelo teste de captura de antígeno (Og4C3), que more na mesma residência de pelo menos um portador de microfilaremia, que não possua antecedentes de doença filarial e sem manifestações clínicas da doença (avaliação clínica através da anamnese);

3.4.2 Definição de controle:

- Indivíduos positivo pelos testes da GE ou filtração em membrana de policarbonato ou pelo teste de captura de antígeno (Og4C3);

3.5 Variável de exposição principal:

<i>Nível de análise</i>	<i>Definição operacional</i>	<i>Categorização</i>
<i>Reconhecimento humoral das proteínas da composição do AgSE</i>	Banda protéica evidenciada após reação pelo cromógeno (técnica do <i>Western blot</i>) tendo como referência o padrão de pesos moleculares em kilodaltons.	Reconhece Não reconhece

3.5.1 Co-variáveis de estudo:

<i>Nível de análise</i>	<i>Definição operacional</i>	<i>Categorização</i>
Individual		
<i>Sexo</i>	Sexo do entrevistado	Masculino Feminino
<i>Idade</i>	Idade em anos	5 a 12 anos 13 a 19 anos > 20 anos

3.6 Testes de Diagnóstico Empregados

- **Gota espessa mensurada (GE)**

A confecção da GE é realizada por perfuração da extremidade digital com lanceta descartável e puncionados cerca de 60 µl de sangue. A gota de sangue é distribuída em lâmina de vidro devidamente identificada, deixada secar e organizada em caixas para processamento em laboratório.

Em laboratório as lâminas passaram pelos processos de desmembrinização por imersão em água, fixação por metanol e coloração pela hematoxilina (método de Carazzi). A análise hemoscópica foi feita por observação em microscópio óptico com lentes objetivas e oculares correspondente a um aumento 100 vezes. Para controle de qualidade 20% do total de lâminas foram submetidas a uma segunda leitura no microscópio por um outro observador. Foram consideradas positivas as lâminas onde uma ou mais microfilárias foram identificadas. Os indivíduos identificados positivos por esta técnica integram o grupo de portadores de microfilaremia.



Figura 8 – Forma embrionária de *Wuchereria bancrofti* (microfilária). Corada com hematoxilina pelo método de Carazzi.

- **Filtração**

A técnica de filtração consiste na passagem do sangue com anti-coagulante por membrana de policarbonato com 3 μ m de poro. Os filtros foram fixados em metanol, corados por hematoxilina e observados em microscópio óptico com lentes objetivas e oculares correspondente a um aumento de 100 vezes e obedecendo aos mesmos critérios de controle de qualidade utilizado para GE. Este teste foi utilizado nos casos duvidosos de GE e em indivíduos portadores de alta parasitemia. Foram considerados positivos os filtros onde uma ou mais microfilárias foram identificadas.

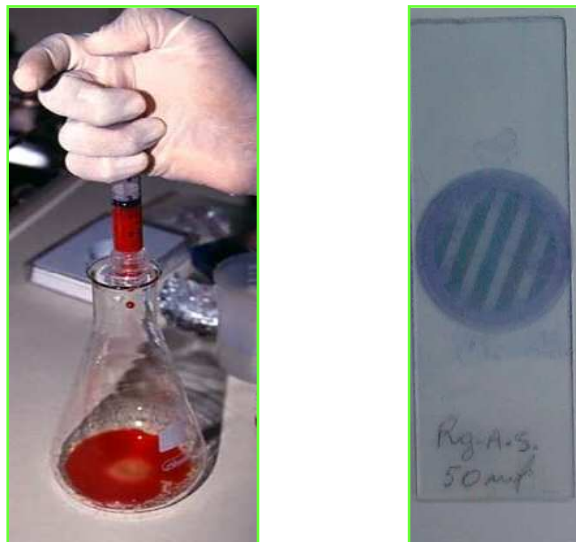


Figura 9 – a) Técnica de filtração de sangue através de membrana de policarbonato b) Membrana corada por hematoxilina

- **Teste de captura de antígeno**

Teste que utiliza o anticorpo monoclonal Og4C3 (Trop-Ag *W. bancrofti* comercializado pela JCU Tropical Biotechnology Pty. Ltd., Townsville, Queensland, Austrália) pelo método ELISA. Alíquotas de soro passam por processo de conjugação e adição de um cromógeno que promove intensidade de cor conforme a concentração protéica das amostras. Foram consideradas positivas as leituras de densidade óptica (DO) superior ao valor de cut-off estabelecido pelo fabricante do kit (Figuras 9 e 10).

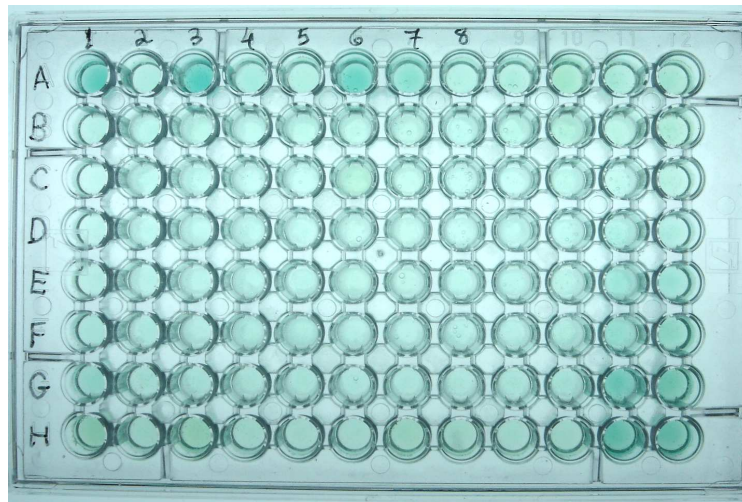
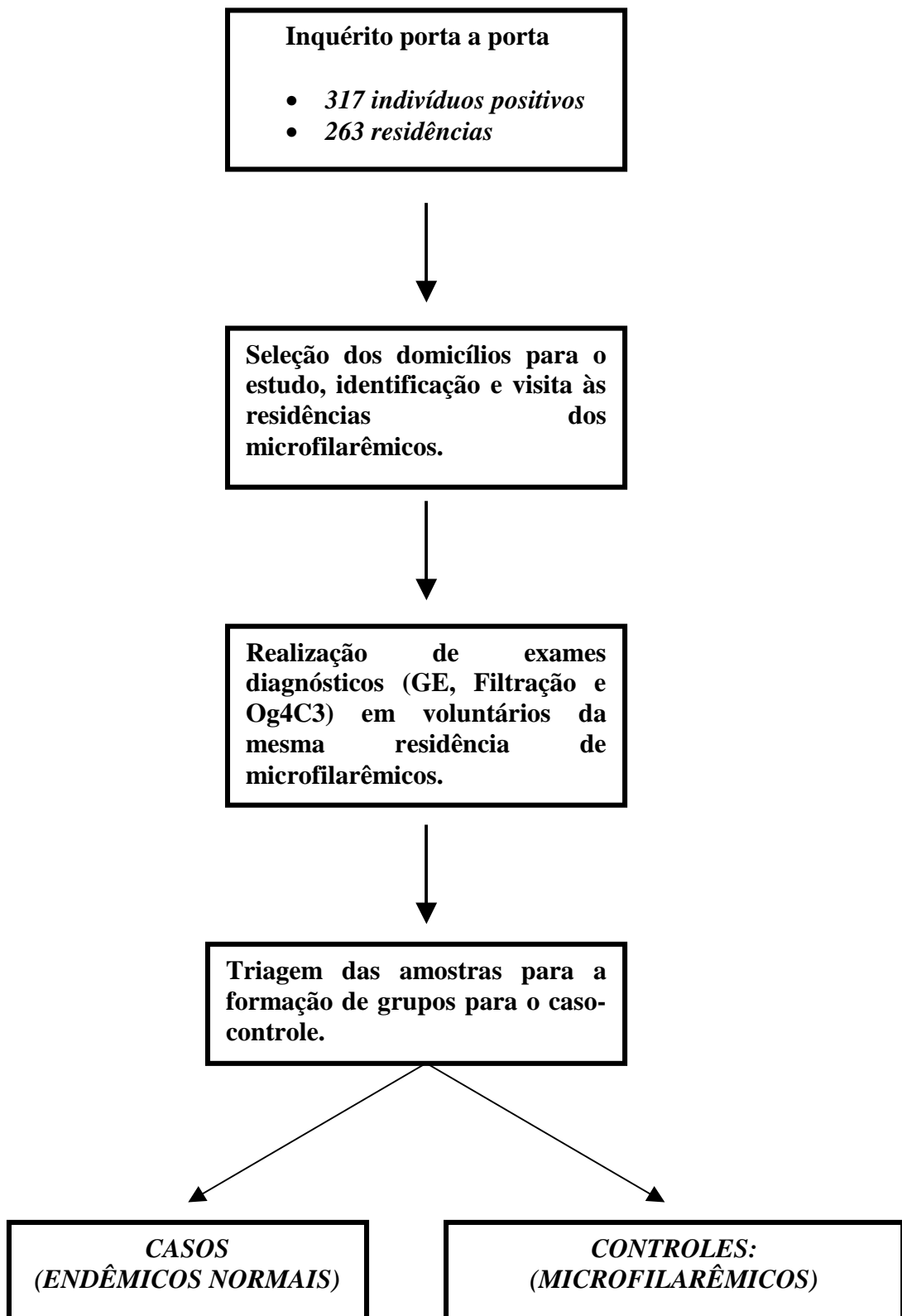


Figura 10 - Placa de ELISA apresentando a reação imunoquímica dos soros com o anticorpo monoclonal Og4C3.



Figura 11 – Kit do Og4C3 - (Trop-Ag *W. bancrofti* comercializado pela JCU Tropical Biotechnology Pty. Ltd., Townsville, Queensland, Austrália).

3.7 Forma esquemática da formação dos grupos de estudo (portadores de filariose linfática bancroftiana e endêmicos normais).



3.8 Coleta de Dados

As amostras de sangue da população investigada foram coletadas nos locais estabelecidos (residências e postos de saúde) por equipe técnica devidamente habilitada para os procedimentos. As coletas de sangue destinadas à GE ou filtração foram realizadas em horário noturno, de 21 às 24h.

3.9 Tratamento dos Pacientes

Os indivíduos diagnosticados positivos para filariose bancroftiana, foram avaliados clinicamente pelo médico responsável, colaborador do projeto de pesquisa, tratados com DEC 50mg (Farmanguinhos, FIOCRUZ-MS) na dose preconizada pela OMS de 6mg/kg/dia, durante 12 dias e encaminhados ao posto de saúde da comunidade para acompanhamento do tratamento.

3.10 Obtenção de Larvas Infectantes em Laboratório

Foram utilizados mosquitos *Cx. quinquefasciatus* fêmeas, linhagem de laboratório mantidos em insetário, originários de populações naturais de áreas urbanas do Recife, fornecidos pelo Departamento de Entomologia (CPqAM-FIOCRUZ).

Para infecção dos mosquitos utilizamos alimentadores artificiais, conforme técnica padronizada por Albuquerque; Neves; Werkhäuser, (1992) (Figura 11). As larvas infectantes foram extraídas por dissecação maciça de mosquitos, após o 15º dia do repasto sanguíneo.



Figura 12 – Alimentação artificial sanguínea dos mosquitos *Cx. quinquefasciatus* para infecção filarial.

3.11 Produção dos Extratos Antigênicos

3.11.1 Extrato de produtos secretórios e excretórios das larvas (AgSE)

As larvas infectantes recuperadas, após dissecação dos mosquitos, passaram por diversas imersões em tampão PBS 0,01M pH 7,2. As larvas vivas, íntegras e consideradas hábeis foram incubadas em meio Hanks pH 7,2 (Bio-Whittaker) ao qual foram adicionados inibidores de protease (TLCK 1mM; PMSF 1mM; e EDTA 1mM) em estufa de cultura com 5% CO₂ a 37°C por 72 horas, para liberação de metabólitos (antígenos secretório/excretório). Por centrifugação a 5,000g por 10 minutos, as larvas foram separadas e o sobrenadante filtrado em membrana estéril de 0,22 µm de poro e dializado contra tampão PBS 0,01M pH 7,2 em membrana (Spectra/Por Membrane MWCO: 6-8,000) em câmara fria (4°C) durante 12 horas. O material obtido foi liofilizado e mantido a -20°C até o momento do uso.

3.11.2 Dosagem de proteínas

O extrato do produto secretório e excretório (AgSE) foi dosado pelo método proposto por SMITH et al., (1985) também conhecido por método do ácido bicinchoninico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolína). Esse método se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm. Este método foi adaptado para reações em microplacas e as leituras realizadas em espectrofotômetro (BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader) com o auxílio do programa Microplate Manager® 4.0 Bio-Rad Laboratories, Inc. Standard Curve.

A curva padrão utilizada nas dosagens foi construída com BSA (proteína albumina bovina) (SIGMA) na variação de concentração protéica de 125µg/ml a 1000µg/ml.

3.12 Reações Imunoquímicas

3.12.1 Técnica de Western-blot

Os ensaios de eletroforese e eletrotransferência foram realizados de acordo com os métodos de LAEMMILI, (1970) e TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, (1979) respectivamente, adaptados por HARLOW; LANE, (1988) e MIRANDA et al., 2005

3.12.2 Eletroforese

Para separação das bandas protéicas, o extrato antigênico AgSE foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE unidimensional.

As amostras foram diluídas em tampão amostra com β -mercaptoetanol na proporção de 2:1, sendo previamente aquecidas a 95°C por cinco minutos antes da aplicação no gel. A concentração do gel de poliacrilamida foi de 4% para a fase de concentração (*stacking*) e 10% para a fase de resolução. As eletroforeses foram realizadas com tampão de corrida Tris-glicina pH 8,6, em cuba de acrílico modelo mini protean II (BIORAD), sob uma corrente contínua de 20 mA/gel. Em todas as separações eletroforéticas, foram corridas paralelamente marcadores de padrões de peso molecular, diluídos com o mesmo tampão amostra.

Após as separações das proteínas os géis foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose (Nitrato de celulose 0,45 μ m), e incubados com os grupos de soros do estudo a uma corrente de 150 mA, as membranas (em tiras) foram lavadas em PBS-Tween 0,05% e incubadas por 18 horas com os soros humanos (primeiro anticorpo) na diluição de 1:20 em PBS 0,01M pH 7,2. Como segundo anticorpo foi utilizado soro de cabra a-IgG humano conjugado com peroxidase cadeia γ específica (SIGMA) e reveladas por solução de 4-Cloronaftol (SIGMA).

As amostras de soros foram organizadas na forma de “pool” juntando-se três soros contendo as mesmas características de sexo, faixa etária e grupo clínico (portadores de filariose bancroftiana ou endêmicos normais). Para cada “pool” de soros foram realizadas reações em triplicata.

3.13 Análise estatística

Realizou-se uma análise descritiva da prevalência da filariose (microfilaremia) por idade e sexo na população de estudo. Estimaram-se as *odds ratio* e os respectivos intervalos de 95% na busca de associações entre o reconhecimento humoral das proteínas nos estratos etários e por sexo. Para tanto foi utilizando o teste Qui-Quadrado de Pearson com correção de continuidade de Yates. Procedeu-se uma análise multivariada por meio da regressão logística utilizando os métodos ENTER e BACKWARD como técnicas de seleção das variáveis.

O Software EPI INFO versão 6.04 foi utilizado para a criação do banco de dados, análise descritiva e associações. Na análise multivariada foi utilizado o software SPSS versão 8.0 for Windows.

3.14 Considerações Éticas

O projeto de tese para a realização deste trabalho teve a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (Anexo I). Em acato às sugestões recebidas durante a qualificação do projeto, houve modificação no título da tese e não na essência metodológica, o título que consta nos TCLEs está de acordo com o apresentado ao CEP/CPqAM.

Todas as coletas de sangue foram realizadas entre os anos de 2000 e 2002 conforme o cronograma do projeto, em voluntários, moradores na área endêmica, que concordaram e assinaram o TCLE. O termo esclarece aos participantes, a natureza e os procedimentos da pesquisa a ser realizada. Foi também informado ao voluntário que os riscos que a pesquisa oferece são os inerentes aos procedimentos de uma punção venosa. A participação de menores de idade só foi permitida após autorização dos pais ou responsável.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil da amostra

4.1.1 Construção dos grupos de estudo para verificação do reconhecimento humoral.

A amostra foi constituída por 325 indivíduos, dos quais 177 (54,5%) do sexo feminino e 148 (45,5%) do sexo masculino (tabela 1). A distribuição com relação à faixa etária foi de 33,2% de adolescentes (13 a 19 anos), 31,4% de crianças (5 a 12 anos) e 35,4% de adultos (20 anos e mais) (tabela 2).

Tabela 1. Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo o sexo.

Sexo	N	%
Masculino	148	45,5
Feminino	177	54,5
Total	325	100,00

Tabela 2. Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo a faixa etária

Faixa etária (em anos)	N	%
5 a 12	102	31,4
13 a 19	108	33,2
20 e mais	125	35,4
Total	325	100,0

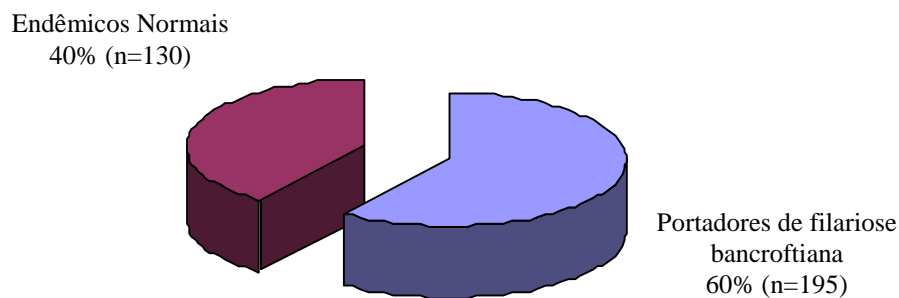
As amostras apresentaram uma distribuição semelhante com relação ao sexo e faixa etária. Não houve diferença significativa quando comparados os quantitativos do sexo masculino e feminino (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo sexo por faixa etária.

Faixa etária	Sexo				Total
	Masculino		Feminino		
	N	%	N	%	
5 a 12	50	33,8	52	29,4	102
13 a 19	50	33,8	58	32,8	108
20 e mais	48	32,4	67	37,9	45
Total	148	100,0	177	100,0	325

$$\chi^2 = 1,19 \quad p = 0,550$$

O estudo foi composto por dois grupos de comparação, distribuídos em portadores de filariose bancroftiana contendo 195 indivíduos, o que corresponde a 60% dos pesquisados, e pelo grupo dos endêmicos normais com 130 indivíduos (Figura 13).

**Figura 13** - Distribuição dos indivíduos pesquisados por grupos de estudo.

Dos 195 soros da composição do grupo de portadores de filariose linfática bancroftiana, 86 foram identificados pelo método de diagnóstico da GE, 17 pelo método de filtração através de membrana, teste que foi utilizado em casos de resultado duvidoso em GE e 92 pelo teste de captura de antígeno Og4C3. Em 185 soros de indivíduos diagnosticados negativos pelo teste da GE, 78 (42,1%) se mostraram positivos ao serem submetidos ao teste imunoenzimático Og4C3. Esse teste identificou o maior número de portadores de filariose bancroftiana.

A densidade parasitária encontrada nos exames da GE variou entre 1 e 437 microfilárias por 60µl de sangue.

Tabela 4. Distribuição dos indivíduos pesquisados segundo densidade de microfilária e faixa etária.

Faixa etária	Densidade de Microfilárias						Total	
	1 a 59		60 a 119		Acima de 120			
	N	%	N	%	N	%	N	%
5 a 12	15	18,5	00	0,0	00	0,0	15	18,1
13 a 19	21	26,0	01	50,0	00	0,0	22	26,5
20 e mais	45	55,5	01	50,0	03	100,0	49	55,4
Total	81	(94,2)	02	(2,4)	03	(3,6)	86	100,0

χ^2 = Não se aplica

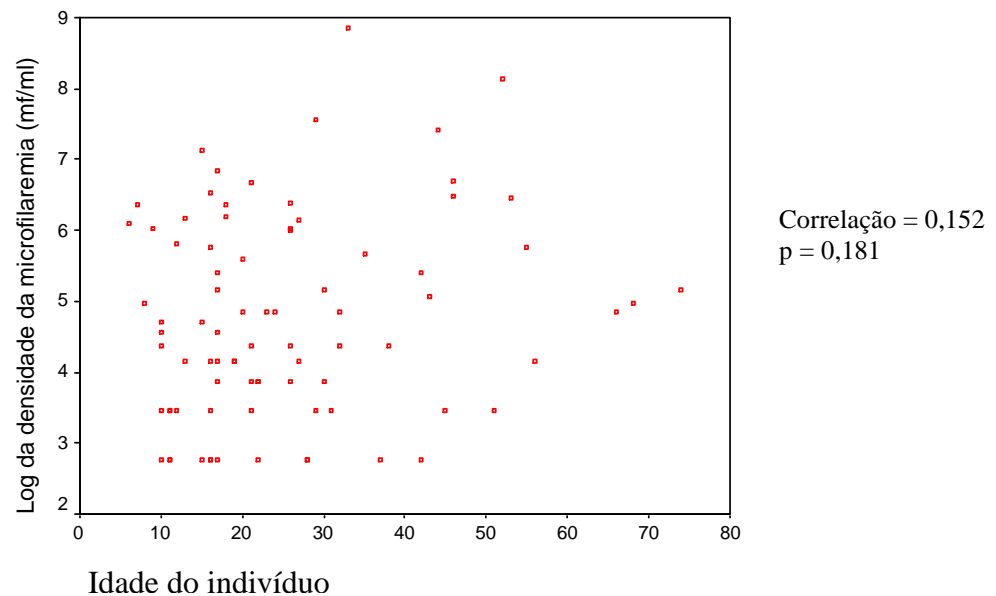


Figura 14. Dispersão das densidades de microfilárias no sangue segundo a idade.

De acordo com a figura 14, não houve um comportamento linear na relação entre a idade do paciente e densidade de microfilária no sangue. Dos 86 indivíduos que realizaram o teste da gota espessa, 94,2% tem densidade abaixo de 60 microfilárias por 60 μ l de sangue, 2,4% de 60 a 119 e 3,6% acima de 120 microfilárias.

Não houve associação significativa quando relacionados os grupos pesquisados com o sexo e faixa etária, o que mostrou uma semelhante distribuição dos grupos de portadores de filariose bancroftiana e endêmicos normais quanto a essas variáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos grupos estudados segundo sexo e faixa etária.

Variável	Grupos				χ^2	p-valor
	Portadores de filariose bancroftiana		Endêmicos normais			
	n	%	n	%		
Sexo					1,987	0,159
Masculino	95	48,7	53	40,8		
Feminino	100	51,3	77	59,2		
Faixa etária					4,37	0,112
5 a 12	53	27,2	49	37,7		
13 a 19	71	36,4	37	28,5		
20 e mais	71	36,4	44	33,8		
Total	195	100,0	130	100,0		

Tabela 6. Distribuição dos indivíduos pesquisados nos grupos de estudo segundo setor censitário de residência. Município de Olinda, 2002.

Setor Censitário	Estudo				Total	
	Portadores de filariose bancroftiana		Endêmicos normais		N	%
	N	%	N	%		
158	43	75,4	14	24,6	57	17,5
173	34	82,9	07	17,1	41	12,6
179	40	54,1	34	25,9	74	22,8
181	78	51,0	75	49,0	153	47,1
Total	195	60,0	130	40,0	325	100,0

O maior número de participantes do estudo para ambos os grupos foram oriundos do setor censitário 181. Observa-se que dentre os setores envolvidos no estudo o setor 173 apresentou o maior percentual de casos de filariose bancroftiana.

4.2 Extrato secretório e excretório (AgSE) - PERFIL PROTÉICO

As bandas protéicas evidenciadas por separação eletroforética apresentaram peso molecular relativo de 200, 175, 138, 105, 100, 76, 55, 49, 42, 39, 38, 32, 28 e 14 kDa (Figura 15).

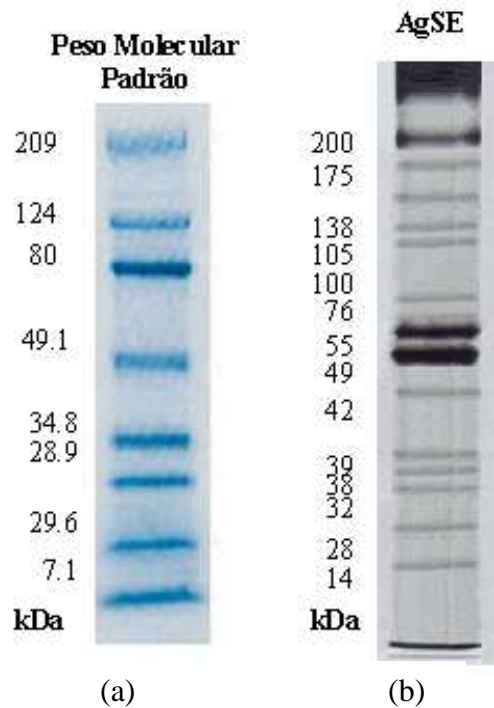
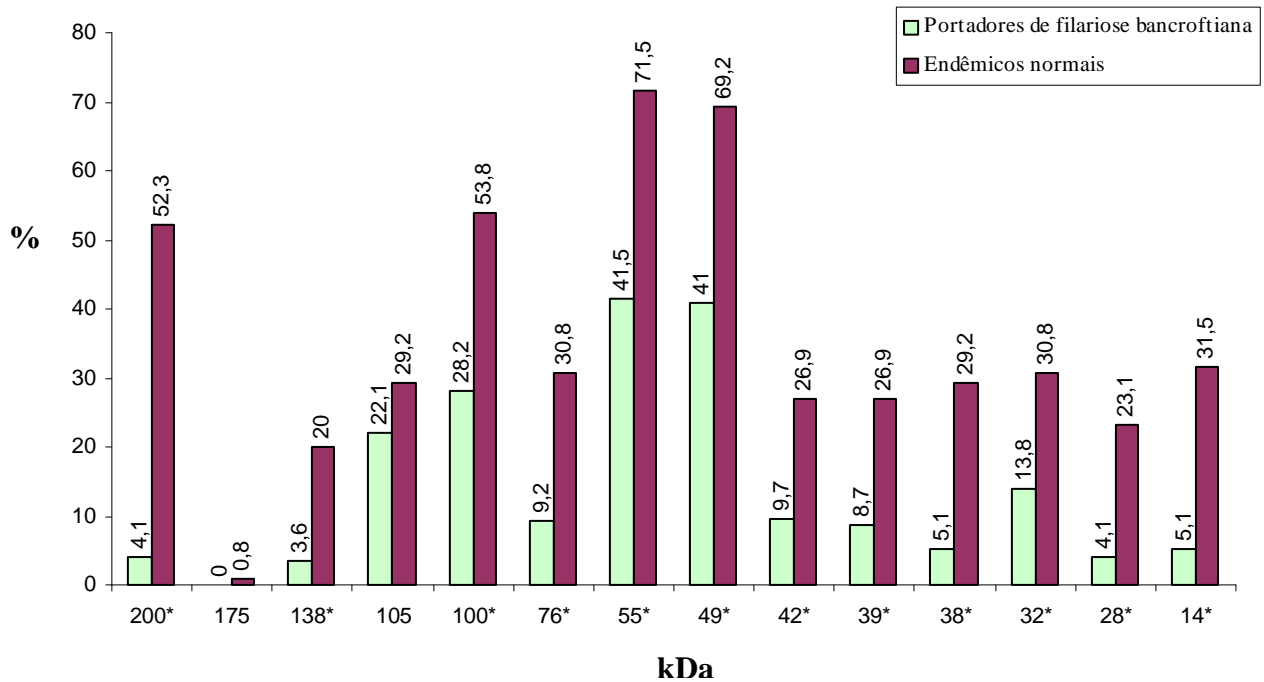


Figura 15 – Perfil protéico representativo do extrato de larvas infectantes (L3) de *W. bancrofti*. Corrida eletroforética realizada em gel de poliacrilamida unidimensional a 10%. (a) Peso molecular padrão: miosina, β -galactose, BSA, ovoalbumina, anidrase carbônica, lisozima, aprotinina (Bio-Rad's SDS-PAGE *molecular weight standards*) com revelação pelo commassie blue; (b) AgSE com revelação pelo método da prata.

4.3 Reconhecimento humoral das bandas protéicas



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura - 16. Percentuais de reconhecimento humoral das proteínas de larvas infectantes de *W. bancrofti* pelos grupos estudados.

Na comparação entre as proporções de reconhecimento das proteínas da composição do extrato de larva L3 entre os grupos estudados (total da amostra), apenas as proteínas 175 e 105 não diferiram significativamente. Nos indivíduos portadores de filariose bancroftiana não houve o reconhecimento da proteína de 175 kDa e no grupo de endêmicos normais apenas um soro foi reconhecido (0,8%). Na proteína de 105 kDa a proporção foi de 22,1% e 29,2%. Em todas as outras, os níveis de reconhecimento dos indivíduos endêmicos normais foram superiores aos dos portadores de filariose bancroftiana. Nos endêmicos normais as proteínas que apresentaram percentual de reconhecimento acima dos 50% foram as bandas de 49, 55, 100 e 200 kDa. No grupo de portadores de filariose bancroftiana nenhuma proteína teve reconhecimento superior a 50%, e, das 14 bandas, 9 (64,3%) tiveram reconhecimento menor que 10%. As que apresentaram maior percentual de reconhecimento, em ambos os grupos, foram as bandas de 49 e 55 kDa. Na proteína de 200 kDa, observa-se uma grande diferença entre os grupos, em que 52,3% dos endêmicos normais a reconhecem contra apenas 4,1% dos portadores de filariose bancroftiana (Figura 16).

4.3.1 Estratificação por sexo

Tabela 7. Relação do reconhecimento de bandas protéicas pelos grupos estudados segundo sexo.

Proteínas	Grupos				χ^2	p-valor
	Portadores de filariose bancroftiana		Endêmicos normais			
	N	%	N	%		
Masculino						
200	04	4,2	24	45,3	37,4	0,000*
175	-	-	01	1,9	0,88	0,707
138	07	7,4	08	15,1	1,46	0,227
105	10	10,5	13	24,5	4,07	0,044*
100	25	24,2	31	58,5	15,8	0,000*
76	12	12,6	14	26,4	3,56	0,059
55	38	40,0	35	66,0	8,21	0,004*
49	42	44,2	34	64,2	4,64	0,031*
42	08	8,4	10	18,9	2,56	0,109
39	09	9,5	12	22,6	3,82	0,051
38	03	3,2	13	24,5	13,97	0,000*
32	11	11,6	19	35,8	10,9	0,001*
28	01	1,1	08	15,1	9,41	0,002*
14	03	3,2	10	18,9	8,61	0,003*
Feminino						
200	04	4,0	44	57,1	59,5	0,000*
175	-	-	-	-	-	-
138	-	-	18	23,4	23,5	0,000*
105	33	33,0	25	32,5	0,06	0,940
100	32	32,0	39	50,6	5,54	0,019*
76	06	6,0	26	33,8	20,8	0,000*
55	43	43,0	58	73,5	7,25	0,000*
49	38	38,0	56	72,7	19,6	0,000*
42	11	11,0	25	32,5	11,08	0,000*
39	08	8,0	23	29,9	12,9	0,000*
38	07	7,0	25	32,5	17,37	0,000*
32	16	16,0	21	27,3	2,69	0,101
28	07	7,0	22	28,6	13,24	0,000*
14	07	7,0	31	40,3	26,6	0,000*

* Associação estatisticamente significativa

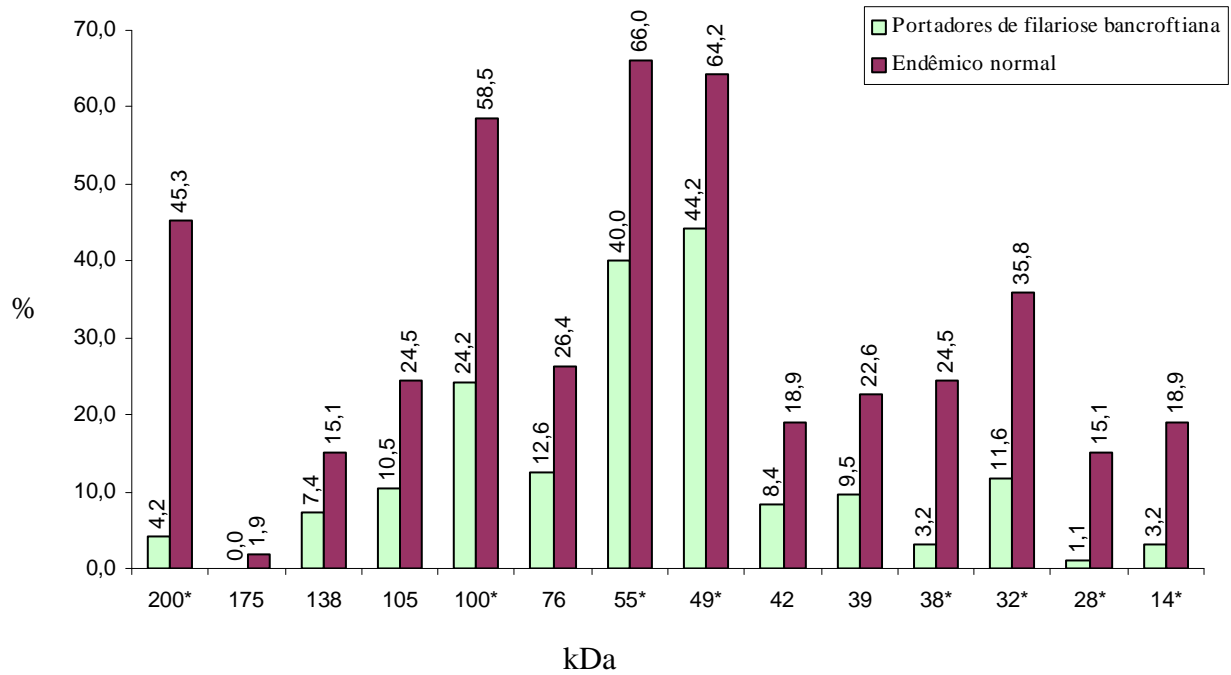


Figura - 17. Proporção de reconhecimento de proteínas de extratos de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* em homens, segundo os grupos de comparação..

Com relação ao sexo (figuras 17, 18 e tabela 7), o perfil de reconhecimento foi semelhante ao total da amostra, apresentando diferenças significativas nos homens nas proteínas 14, 28, 32, 38, 49, 55, 100, 105 e 200 kDa e nas mulheres apenas as proteínas de 32, 105 e 138 kDa não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados.

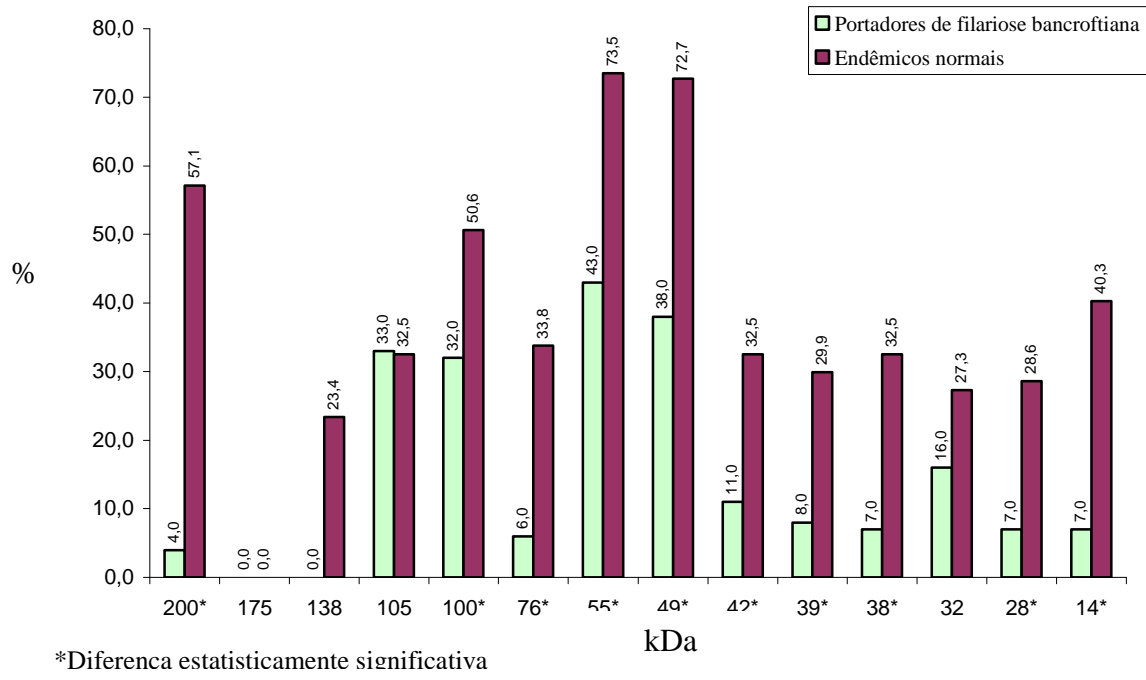


Figura 18. Proporção de reconhecimento de proteínas de extratos de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* em mulheres, segundo os grupos de comparação.

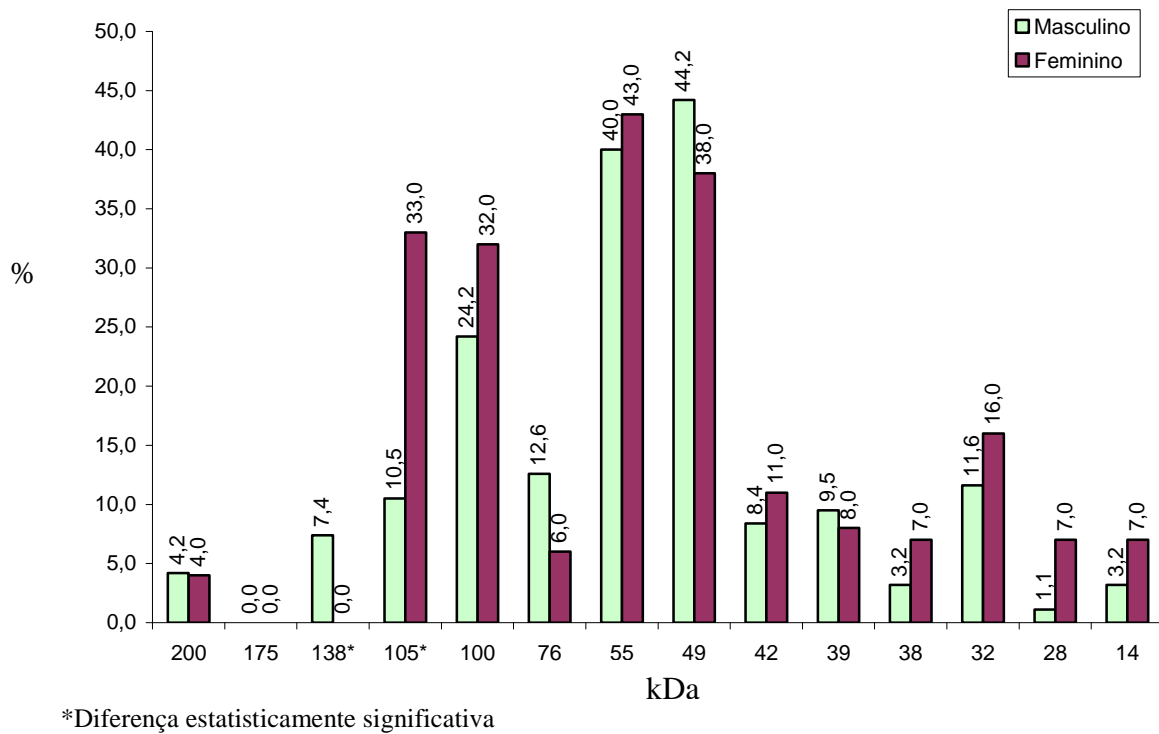
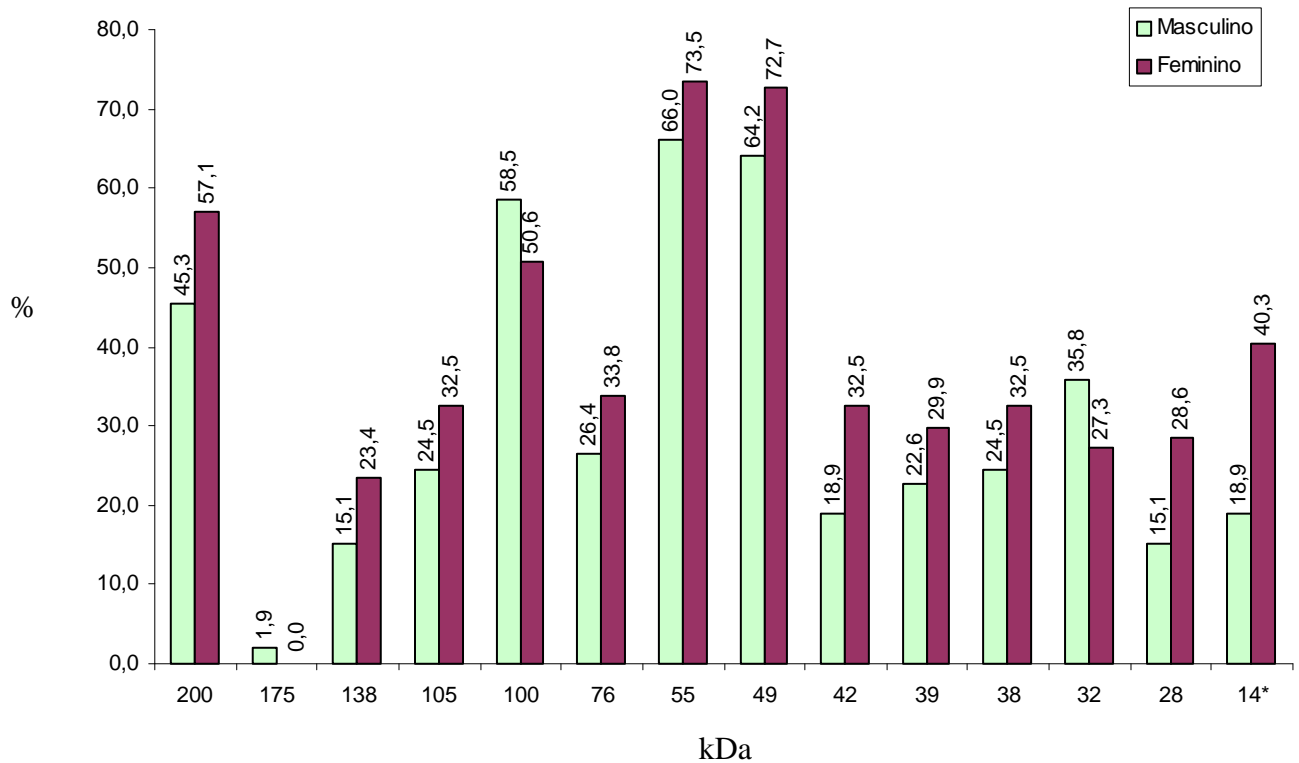


Figura 19 - Proporção de reconhecimento das bandas protéicas nos indivíduos portadores de filariose bancroftiana segundo o sexo.

No grupo dos portadores de filariose bancroftiana (Figura 19) as proteínas de 105 e 138 kDa apresentaram diferença significativa no reconhecimento. Na banda de 105 kDa o percentual de reconhecimento nas mulheres foi de 33% e nos homens 10,5%. Na na banda de 138kDa nenhuma das mulheres a reconheceu enquanto em 7 soros masculinos (7,4%) houve reconhecimento. No grupo de endêmicos normais (Figura 20), somente na proteína de 14kDa houve uma diferença estatisticamente significativa com um percentual de reconhecimento maior no sexo feminino. Tanto no grupo de portadores de filariose bancroftiana quanto no grupo de endêmicos normais, há predominância de reconhecimento no sexo feminino, dado que nos endêmicos normais das 14 bandas estudadas, 11 possuem maior valor percentual de reconhecimento (78,6%). Nos portadores de filariose bancroftiana os maiores valores aparecem em apenas 8 das 14 bandas reconhecidas (57,7%).



* Diferença estatisticamente significativa

Figura 20. Proporção de reconhecimento das bandas protéicas nos indivíduos endêmicos normais segundo o sexo.

4.3.2 Estratificação por faixa etária

Nos indivíduos portadores de filariose, a faixa etária acima dos 20 anos destaca-se com maior percentual de reconhecimento nas bandas protéicas de 38, 39, 49, 55 e 200 kDa, porém em nenhuma delas a diferença foi significativa (Figura 21). Na faixa de 5 a 12 anos não houve reconhecimento das proteínas de 200, 175, 138, 38 e 28 kDa e as que apresentaram maior prevalência foram as de 42 e a 76 kDa, com equivalência com a faixa de adultos. A faixa etária de 13 e 19 anos se mostrou mais prevalente nas proteínas 100 e 105 kDa, e não reconheceu as proteínas de 175 e 38 kDa.

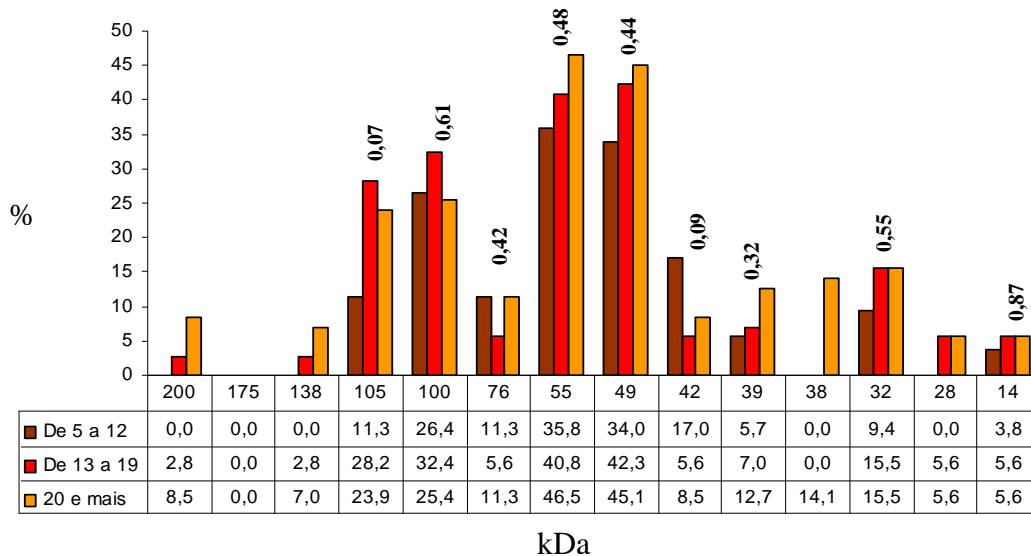


Figura 21 - Proporção de reconhecimento de proteínas de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* nos indivíduos portadores de filariose bancroftiana segundo faixa etária.

No grupo de endêmicos normais, nota-se a existência de um reconhecimento crescente em relação às faixas etárias mais velhas, exceto nas proteínas de 42 e 39 kDa. Houve diferenças significativas nas proteínas de 200, 138, 105, 76, 55, 32, 28 e 14 kDa.

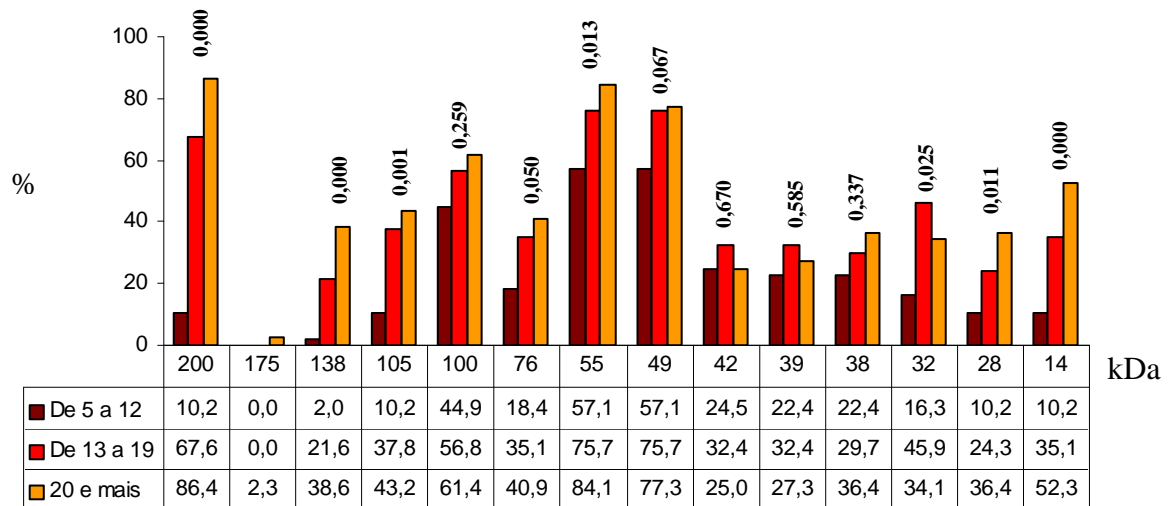
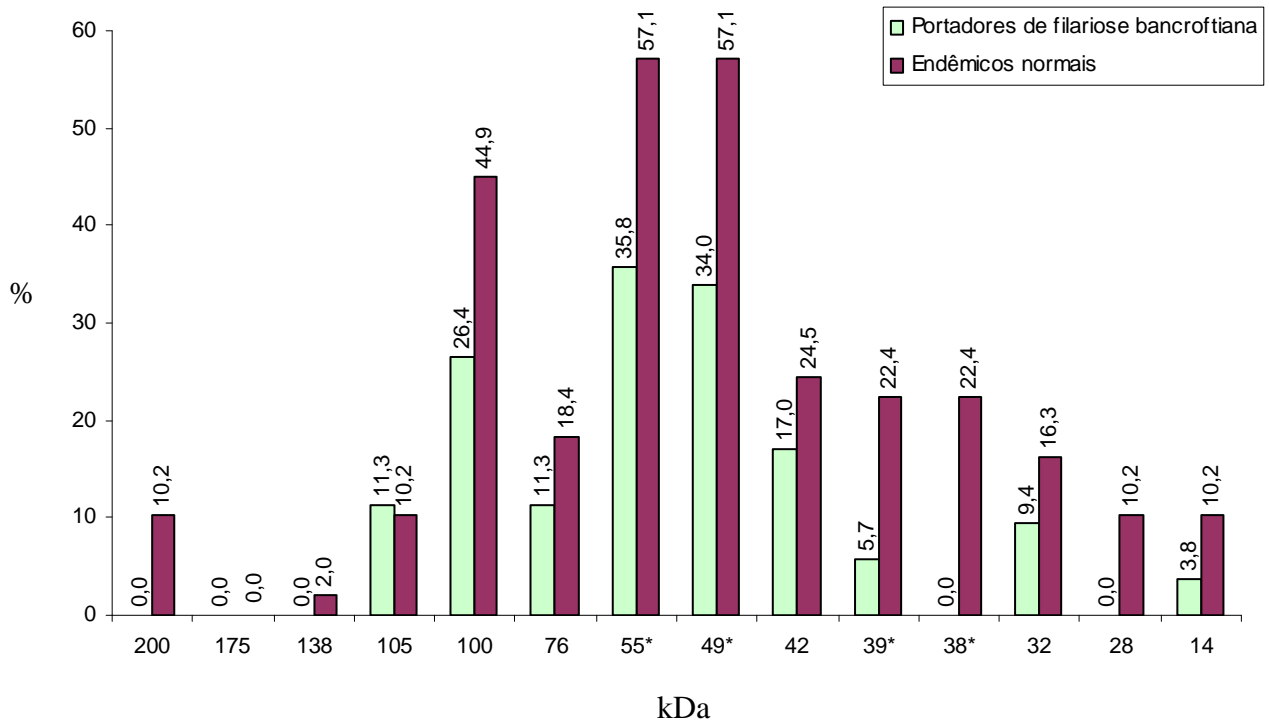


Figura 22 - Proporção de reconhecimento nos indivíduos endêmicos normais das proteínas pesquisadas por faixa etária.

No estrato dos indivíduos entre 5 e 12 anos, o grupo de endêmicos normais obteve o maior percentual de reconhecimento em todas as bandas protéicas. As mais prevalentes (acima de 50%) foram as 55 e 49kDa. Comparando com o grupo de portadores de filariose bancroftiana o padrão de reconhecimento é semelhante, embora, em menores proporções para todas as bandas protéicas.



*Diferença estatisticamente significativa

Figura 23 - Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de *W. bancrofti* pelo grupo etário de 5 a 12 anos, por grupo de estudo.

Relacionando os indivíduos entre 13 e 19 anos, em todas as bandas protéicas estudadas, o grupo de endêmicos normais tem percentual de reconhecimento maior e significativo. Nesta faixa etária há reconhecimentos acima dos 50% das proteínas de 200, 100, 49 e 55 kDa. O padrão de reconhecimento difere entre os grupos, destacando-se as proteínas de 105, 100, 55 e 49 kDa entre os portadores de filariose bancroftiana. A maior diferença de reconhecimento observada entre os grupos, foi em relação à proteína de 200 kDa (figura 25).

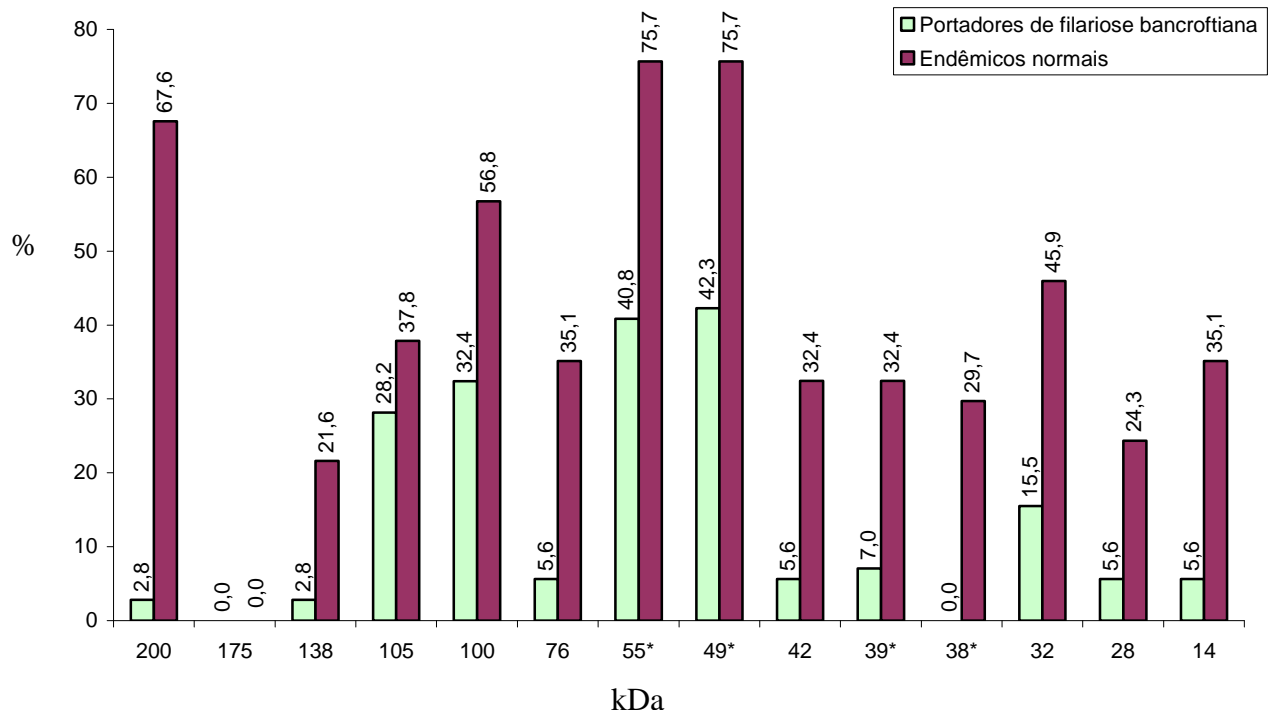


Figura 24 - Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* pelo grupo etário de 13 a 19 anos, por grupo de estudo.

Na faixa acima dos 20 anos, observa-se um comportamento semelhante entre as outras faixas, tendo destaque a proteína de 200 kDa no grupo dos endêmicos normais, assim como as de 49 e 55 kDa (Figura 25).

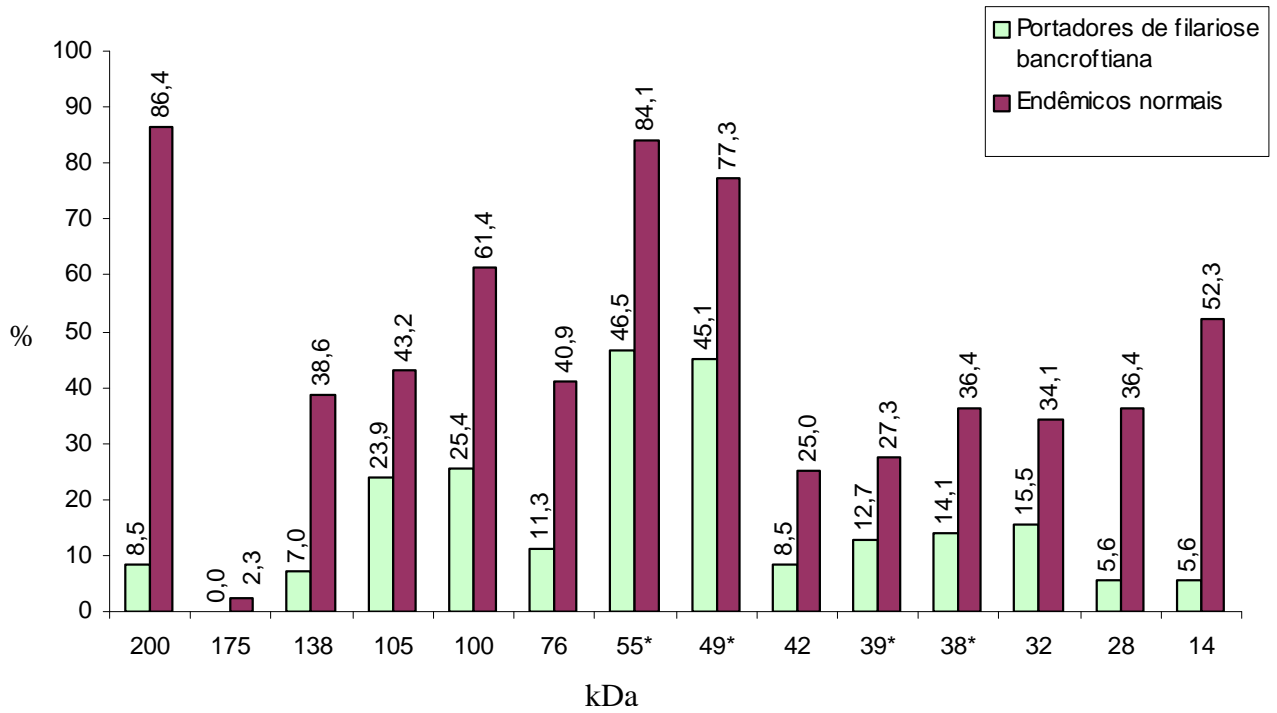


Figura 25 - Proporção de reconhecimento das proteínas de extrato de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* pelo grupo etário acima de 20 anos, por grupo de estudo.

4.4 Regressão logística

Aplicando a regressão logística no ajuste das associações das proteínas com os grupos de portadores de filariose bancroftiana e de endêmicos normais e considerando a idade e o sexo como variáveis pertencentes ao modelo, observou-se que a proteína de 200 kDa se mostrou a mais forte associada aos grupos de comparação, seguida pela proteína de 138 kDa. Houve significância estatística nas proteínas de 76, 38, 28 e 14 kDa. (Tabela 8)

Tabela 8. Regressão logística com o método “ENTER” da associação do reconhecimento protéico pelos grupos de estudo ajustadas por sexo e faixa etária.

Proteínas em kDa	Odds Ratio	IC(95%)	p-valor
200	55,46	15,57 – 197,43	0,0000*
175	-	-	-
138	12,81	2,36 – 69,5	0,0031*
105	1,33	0,5189 – 3,4157	0,5517
100	1,50	0,6955 – 3,2711	0,2981
76	3,68	1,2893 – 10,5201	0,0149*
55	2,05	0,6004 – 7,0390	0,2511
49	1,51	0,4389 – 5,1916	0,5135
42	1,96	0,7785 – 4,9629	0,1527
39	1,84	0,7035 – 4,8160	0,2138
38	5,48	1,5611 – 19,2511	0,0079*
32	2,39	0,8633 – 6,6385	0,0934
28	8,03	1,8896 – 34,2046	0,0048*
14	8,19	2,5028 – 26,8134	0,0005*

* Razão de prevalência estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

IC – Intervalo de confiança

Com a utilização da regressão logística foram retiradas as variáveis não verdadeiramente associadas (método backward). A variável faixa etária permaneceu no modelo final, assim como as proteínas de 200, 138, 76, 55, 38, 28 e 14 kDa, sendo essas associações significativas ao nível de 5%, como também as proteínas 42 e 32 kDa, apesar de não significativas ao nível de confiança adotado (Tabela 9).

Tabela 9. Verificação das associações entre as variáveis incluídas no estudo utilizando a regressão logística com o método “BACKWARD”.

Variáveis independentes	Odds Ratio	IC(95%)	p-valor
Faixa etária			0,2853
20 e mais	1,00	-	-
13 a 19	0,0168	0,0043 – 0,0652	0,0000*
5 a 12	0,0846	0,0307 – 0,2334	0,0105*
Proteínas			
200	71,52	20,31 – 251,77	0,0000*
138	11,79	2,42 – 57,38	0,0022*
76	4,24	1,55 – 11,58	0,0049*
55	3,00	1,48 – 6,11	0,0023*
42	2,18	0,89 – 5,33	0,0857
38	6,66	1,90 – 23,25	0,0030*
32	2,40	0,88 – 6,50	0,0842
28	8,32	2,04 – 33,89	0,0031*
14	7,86	2,50 – 24,69	0,0004*

* Estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

As proteínas 175, 105, 49, 100 e 39 kDa foram excluídas do modelo quando utilizado a análise multivariada por não apresentarem forte associação ou significância com os grupos de estudo.

5. DISCUSSÃO

Os indivíduos residentes em áreas endêmicas de filariose linfática estão continuamente expostos à infecção por larvas infectantes (L3) pelo constante contato com o mosquito vetor, transmissor da doença. Muitas destas larvas resistem às barreiras físicas e imunológicas dos culicídeos, invadem o organismo do hospedeiro humano, desafiam o sistema imune celular e humoral, tornam-se vermes adultos e atingem a fase reprodutiva, com uma fantástica produção de embriões, as microfilárias. Questiona-se a ocorrência da resistência adquirida naturalmente em alguns indivíduos residentes destas áreas endêmicas e esse é o grande interesse para o desenvolvimento de vacinas moleculares contra parasitas filariais.

Na região do grande Recife, área considerada endêmica de filariose linfática bancroftiana, assim como em outras regiões do mundo com a mesma endemia, a grande maioria dos habitantes são aparentemente imunes à infecção filarial; poucos possuem microfilárias circulantes e uma pequena proporção de parasitados desenvolve sintomas clínicos evidentes (MICHAEL, 2000). Para um maior entendimento sobre os diversos aspectos dessa endemia, ainda torna-se necessário uma melhor compreensão a respeito da expressão das respostas imunológicas por populações expostas às diferentes fontes de antígenos que as acometem. Essa compreensão, certamente contribuirá para a identificação de antígenos com potencial importância para diagnóstico e, principalmente, para evidenciar proteínas com capacidade imunoprotetora.

Sob o ponto de vista imunológico, a filariose linfática tem sido considerada como um dos processos patológicos mais complexos dentre as infecções causadas por parasitos. Essa complexidade envolve elementos como tolerância, imunopatologia e a extensa dinâmica da infecção. Entre os pesquisadores que se dedicam ao estudo da filariose linfática, ainda não existe um consenso a respeito do entendimento da doença, seja na área da patologia, imunidade protetora, ativação de células T, seja no mecanismo de depuração parasitária (SEMNANI; NUTMAN, 2004). A Organização Mundial da Saúde tem incentivado essa abordagem sob a argumentação de que essa linha de investigação deveria ser vista como o objetivo primário nas pesquisas sobre filariose linfática (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). No entanto, o que se percebe na literatura científica é a existência de relativamente poucos estudos dirigidos para a elucidação das respostas imunológicas em humanos portadores de filariose linfática.

A exclusividade do homem como hospedeiro definitivo de *W. bancrofti* representa a principal dificuldade em se investigar e adquirir material biológico para os estudos, tanto pelo respeito que se deve ter às questões éticas em experimentações que envolvam o ser humano, quanto pelos diversos obstáculos enfrentados na realização de trabalhos de campo como o acesso às moradias, geralmente sediadas em locais com alto índice de violência urbana, além da particularidade da filariose bancroftiana que na maioria das áreas endêmicas só permite a detecção parasitária em horário noturno.

Nos estudos existentes sobre imunidade em filariose linfática, os restritos modelos experimentais animais que respondem à infecção filarial, mostram um determinado reconhecimento imune diferencial entre os que se infectam e os que permanecem resistentes à infecção. Em humanos, as informações existentes sobre esse mecanismo são ainda consideradas incipientes e os estudiosos nesse assunto têm considerado o endêmico normal como um modelo para identificar a correlação com a imunidade protetora (OTTESEN, 1984; FREEDMAN; NUTMAN; OTTESEN, 1989).

Conforme já descrito anteriormente, a designação de endêmico normal é atribuída ao residente de área endêmica resistente à infecção, apesar da exposição ao parasito. Este trabalho, desenhado na forma de um estudo do tipo caso-controle, considerou os endêmicos normais como o grupo de casos, admitindo a hipótese da existência da imunidade protetora para esse grupo.

O trabalho aqui apresentado possui características que o distinguem de vários outros que também buscam esclarecimentos quanto à resposta imune humoral humana em filariose bancroftiana. O material protéico utilizado como antígeno, nas reações imunoquímicas, foi obtido pela produção de extrato concentrado do material secretório e excretório de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti*. Esse extrato foi obtido a partir do acúmulo das frações produzidas em cultivo de larvas. Todo o cuidado foi tomado para a não contaminação do meio, nos processos de purificação por filtrações. Os produtos secretórios são conhecidos por possuírem um importante papel na interação parasito-hospedeiro e sua caracterização pode contribuir para o entendimento das interações biológicas que ocorrem entre o hospedeiro e o parasito. De acordo com os resultados apresentados por MIRANDA et al., (2005), o material protéico secretado por larvas infectantes de *W. bancrofti* demonstrou por imunofluorescência e *western-blot*, o maior reconhecimento de bandas, quando comparado ao extrato somático aquoso e ao extrato processado com adição de detergentes aniônicos, entretanto foi verificado, por eletroforese em gel de acrilamida a 10%, que os perfis protéicos podem variar dependendo da forma com que são processados.

Nesse trabalho a possibilidade da ocorrência de inespecificidade nas reações antígeno/anticorpo foi descartada, desde que empregou-se como primeiro anticorpo amostras de soro humano de residentes de área endêmica de filariose bancroftiana e como antígeno, extrato de larvas infectantes de *W. bancrofti*, obtidas a partir da evolução de microfilárias sanguíneas coletadas dos mesmos residentes da área. Muitos dos artigos científicos publicados com esse tema utilizaram extratos de microfilárias, larvas ou vermes adultos de outras espécies de filárias, comumente *Brugia malayi*, para promover reações imunológicas com amostras de soros humanos de portadores de filariose bancroftiana (KAZURA; CICIRELLO; FORSYTH, 1986; LAWRENCE et al., 2001). As espécies de *Brugia* podem parasitar animais experimentais como jirds, cães, gatos e alguns primatas (WEIL et al., 1992; MURTHY et al., 1999; DUBE et al., 2004).

Com relação à casuística, testamos um número maior de amostras de soros do que a maioria dos estudos anteriores. Isso permitiu conferir valor estatístico às diferenças encontradas nos resultados da reatividade de anticorpos entre os grupos de comparação.

De modo a evitar o viés do erro de classificação na composição dos grupos, o método parasitológico da gota espessa foi utilizado na triagem dos indivíduos voluntários e as amostras de soro foram submetidas ao teste imunoenzimático (Og4C3) para detecção de antígenos filariais livres. Esse teste, além de oferecer alta sensibilidade diagnóstica é conveniente por não apresentar restrições quanto ao horário de coleta de sangue para as análises.

Embora não tenha sido objetivo desse estudo uma comparação ou validação de métodos, pôde ser verificado que o método convencional parasitológico para detecção de microfilaremia, o da gota espessa, ainda considerado como “padrão ouro” para demonstrar epidemiologicamente o impacto de intervenções, deixou de identificar 42,1% de amostras de portadores de filariose bancroftiana. Esse resultado vem a corroborar estudos realizados por vários autores que validam o kit de diagnóstico da Trop Bio Pty. Ltd, Austrália e que consideram, até o momento, seja o mais acurado parâmetro para identificação de portadores de filariose bancroftiana (TURNER et al., 1993; ROCHA et al., 1996; LALITHA et al., 1998; SAHOO et al., 2000; ROCHA et al., 2004)

O inquérito epidemiológico para verificação da filariose no Município de Olinda realizado no período de 1999-2000 (BRAGA et al., 2001) investigou 80 setores censitários dentre os 242 existentes no município, encontrando um valor de prevalência de 1,3%. Esse índice, embora seja considerado como de baixa endemicidade (KUMAR, 1996), é preocupante quando se leva em consideração a baixa sensibilidade do teste de diagnóstico que foi empregado (GE), a aleatoriedade da amostra e, principalmente, o grande

contingente do mosquito vetor (*Culex quinquefasciatus*) na região. A forte característica focal da doença, também pôde ser constatada uma vez que verificamos, quando da realização da investigação diagnóstica nos quatro setores escolhidos para o estudo, 6% de positividade de microfilaremia, utilizando o mesmo teste diagnóstico, o da gota espessa mensurada.

Para verificar a existência das diferenças entre o perfil de reconhecimento humoral de bandas protéicas entre os grupos de estudo, foi utilizado a técnica de *Western-blot*. Essa técnica possui alta sensibilidade em reações de reconhecimento específico dos antígenos através de anticorpos e é o mais adequado teste imunológico para se obter informações sobre presença, peso molecular e quantidade de antígeno, após a separação das proteínas por eletroforese de gel. As análises dos resultados de reconhecimento de proteínas foram feitas comparando-se grupos estratificados segundo o sexo e faixas etárias. O número de amostras por grupo de estudo apresentou quantitativos equivalentes, sem diferença significativa. A proporcionalidade obtida ficou associada ao acaso, desde que a forma de agrupamento das amostras estava somente condicionada aos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos.

Foram identificadas 14 bandas protéicas após separação por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. As bandas protéicas evidenciadas apresentaram os seguintes valores de peso molecular relativo: 200, 175, 138, 105, 100, 76, 55, 49, 42, 39, 38, 32, 28 e 14 kDa. Esse perfil protéico foi repetitivo nas diversas corridas eletroforéticas realizadas, sugerindo que algumas proteínas da composição do extrato não tenham sido identificadas por possuírem concentrações abaixo da detecção da técnica utilizada.

Os resultados de reconhecimento de proteínas obtidos, quando comparados os dois grupos de estudo (endêmicos normais e portadores de filariose), mostraram que soros de indivíduos endêmicos normais reconhecem o maior número de bandas protéicas da composição do extrato antigênico, sendo a diferença significativa quando comparamos esse grupo ao dos portadores da filariose bancroftiana. A maior diferença no reconhecimento entre os grupos foi percebida na banda protéica de 200 kDa (Figura 16).

Analisando as diferenças entre os grupos com relação ao sexo, foi verificado que em ambos os sexos o perfil de reconhecimento continua conservado, ou seja, os percentuais de reconhecimento no grupo de endêmicos normais sempre apresentam os maiores valores. Observa-se, no entanto, que entre mulheres, existe um maior número de proteínas que diferem significativamente nos grupos de estudo. Esses resultados mostram que na população estudada, as mulheres exibem uma melhor resposta imune humoral quando da exposição a larvas infectantes. Analogamente, observamos que o sexo masculino apresentou uma menor resposta humoral à infecção filarial. Uma maior susceptibilidade à infecção

filial pelo sexo masculino tem sido percebida em resultados de inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil e em várias regiões endêmicas do mundo (BRABIN, 1990; ALBUQUERQUE et al., 1995; CHANTEAU et al., 1995; MACIEL et al., 1996). BRAGA et al., (2005) realizaram na mesma área deste trabalho, um estudo que teve como objetivo investigar o papel dos fatores biológicos e o nível de exposição ao vetor no estabelecimento das variações, entre sexos, quanto à ocorrência de filariose bancroftiana, durante a puberdade. Os resultados desse estudo mostraram que não houve mudanças significativas quanto ao risco de ocorrência de filariose nas meninas, sugerindo que a produção de hormônios nessa população não contribui para este fenômeno, embora exista uma maior propensão à infecção filial no sexo masculino, a partir da puberdade tardia.

Ao comparamos as diferenças de reconhecimento segundo o sexo, o perfil de reconhecimento protéico do grupo de portadores de filariose bancroftiana, apresentou valores percentuais menores, tanto nas proteínas de baixo peso molecular quanto em proteínas mais pesadas (Figura 19). Destaca-se nesse grupo uma diferença significativa no reconhecimento da proteína de 105kDa entre homens e mulheres. A mesma análise feita no grupo de endêmicos normais revela também que as diferenças de reconhecimento do grupo com relação ao sexo não demonstram grandes diferenças percentuais. Nota-se, portanto, conforme já mencionado, que esse grupo eleva os valores percentuais de reconhecimento para todas as bandas protéicas (Figura 20).

Quanto à análise das amostras estratificadas por faixas etárias (5 a 12, 13 a 19 e acima de 20 anos de idade), observamos que em ambos os grupos de comparação ocorre um maior reconhecimento protéico na faixa etária mais velha (acima de 20 anos). Nos portadores de filariose bancroftiana não há diferenças significativas nos percentuais entre os grupos etários, sendo as proteínas de 38, 39, 49, 55 e 200 kDa as mais prevalentes. No grupo de endêmicos normais a faixa etária acima de 20 anos também mostrou os mais elevados percentuais de reconhecimento, e, na maioria delas, as diferenças foram significativas quando comparadas com as outras faixas. Observando os resultados das figuras 21 e 22 verificamos o aumento da reatividade nos soros dos indivíduos mais velhos sugerindo que as pessoas adquirem um grau de imunidade à filariose depois de anos de exposição ao parasita, confirmando assim, os dados epidemiológicos obtidos por Day; Gregory; Maizels, (1991). Os valores de prevalência em áreas endêmicas tendem a aumentar na população denominada “adulto jovem”, declinando com o passar dos anos (GRENFELL; MICHAEL, 1992). Uma forte evidencia da imunidade adquirida foi percebida por Grenfell et al., (1991) em experimentos com gatos com carga macrofilarial de *B. pahangy*, que após repetitivas inoculações com larvas infectantes constataram significativa redução na microfilaremia.

A análise exploratória dos dados incluiu tabelas de frequência simples e tabelas cruzadas com medidas de associação e com testes de significância quando apropriados. Foi utilizada a análise de regressão logística para identificar o modelo explicativo. O método passo a passo (*backward stepwise*) foi empregado para manter no modelo de regressão apenas as variáveis independentes significantes ($p < 0,05$). O método backward consta de um modelo matemático completo onde as variáveis são sucessivamente eliminadas (uma por vez). A primeira variável eliminada é aquela que tem a menor contribuição para a redução da soma dos erros quadráticos de previsão, as próximas variáveis não significativas são eliminadas em seqüência. O processo termina quando todas as variáveis não significativas são eliminadas.

O método de regressão logística foi escolhido pelo fato do problema em questão ter uma variável dependente binária, tornando-o apropriado, além do fato de ser computacionalmente mais simples.

Em Epidemiologia, a regressão logística tem como objetivo descrever a relação entre um resultado (variável dependente ou resposta) e um conjunto simultâneo de variáveis explicativas (preditoras ou independentes), mediante um modelo que tenha bom ajuste, que seja biologicamente plausível e obedeça ao princípio da parcimônia (HOSMER; LEMESHOW, 1989).

Foram aplicados ao programa todas as variáveis trabalhadas face aos resultados de reconhecimento das bandas protéicas. Os resultados mostraram que a variável “faixa etária” permaneceu no modelo final e desta maneira, essa variável foi considerada pelo programa como importante na análise. As bandas protéicas consideradas variáveis com significância de 5% mantidas no modelo, foram as de 200, 138, 76, 55, 38 28 e 14 kDa, (Tabela 9).

Os nematóides filariais liberam além de produtos secretório e excretório, componentes biologicamente ativos e importantes na sobrevivência do parasito (HARNETT, 1997). Algumas dessas moléculas são imunoregulatórias podendo suprimir a natural defesa imune do hospedeiro aos antígenos parasitários.

Embora não tenhamos caracterizado as bandas protéicas encontradas por testes com anticorpos monoespecíficos, algumas bandas apresentaram valores de peso molecular relativo, semelhantes às que têm sido apontadas em trabalhos de reconhecimento humoral e que são consideradas como antígenos protéicos de importância imunológica profilática para filariose linfática. Forsyth em 1986, encontraram uma molécula de 25 kDa, extraída de extratos de microfilárias de *B. malayi*; Parab et al., em 1988 identificaram três proteínas (25, 58 e 68 kDa) componentes de microfilárias de *B. malayi* e reconhecidas por soros de endêmicos normais; Freedman; Nutman; Ottesen em 1989, identificaram uma proteína de

43 kDa de larva infectante de *B. malayi*; Kazura; Cicirello e Chenthamarakshan; Reddy; Harinath, em 1995, identificaram uma proteína de 120 kDa denominada BmA-2 da fração antigênica de verme adulto de *B. malayi*.

Ensaio com modelos experimentais têm mostrado que a imunização com larvas infectantes mortas ou através de inoculação com antígeno total de larvas, induzem a uma proteção parcial ou não causam qualquer proteção contra os desafios da infecção ou infecções recorrentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Ao contrário, a vacinação com larvas infectantes atenuadas ou irradiadas induzem a resistência em vários modelos experimentais (LANGE et al., 1993). Esses trabalhos sugerem que algumas atividades metabólicas de larvas infectantes no hospedeiro sejam necessárias para indução da resposta da imunidade protetora. Diante disso, considera-se que produtos protéicos, oriundos dos componentes secretório/excretório de larvas infectantes, possam ser de fundamental importância para a questão da proteção e possíveis candidatos para desenvolvimento de vacinas (SELKIRK; MAIZELS; YAZDANBAKHSI, 1992). A imunidade protetora se mostrou efetiva contra *Aconthocheilonema vitae* após imunização em jirds com extratos secretório/excretório de larvas infectantes e também com formas pós invasivas (L4) (LUCIUS et al., 1991).

Algumas experiências de imunização passiva foram realizadas por muitos pesquisadores visando avaliar a efetividade desses antígenos como candidatos na indução de imunidade ou sua efetividade como agente terapêutico. Chenthamarakshan; Reddy; Harinath, (1995), verificaram em experimentações com jirds, que somente 35% de larvas infectantes sobrevivem mais do que 10 dias dentro de jirds que tenham recebido o anti-soro anti-CFA -6.

A proteína de 43-kDa de larva infectante de *B. malayi* foi reconhecida por 100% dos soros de indivíduos endêmicos normais, porém por apenas 8% dos indivíduos microfilarêmicos (Raghavan et al., 1994). Essa proteína de 43-kDa de *B. malayi* foi clonada e apresentou forte homologia em quitinases. Dos sete domínios de quitinase altamente conservados na molécula, cinco domínios também foram identificados no antígeno de 43-kDa. Fuhrman et al., em 1995, descreveram a função e a estrutura de uma família de isozimas de quitinase em microfilárias de *B. malayi*. Uma ação antimicrofilarial foi percebida, após uma imunização pela quitinase, o que resultou na indução de uma parcial proteção contra microfilárias, após infecção subsequente de *B. malayi*, porém não foi verificada a redução da carga de vermes adultos. Um semelhante efeito de atividade anti-filarial foi observado pelos mesmos autores com um antígeno de 120 kDa de verme adulto

de *B. malayi*. Este estudo explorou o potencial anti L3 e anti-microfilária, após a imunização com antígeno de 120 kDa.

Com o crescimento exponencial do programa de eliminação da filariose linfática, torna-se necessário a implementação de ferramentas de diagnóstico que possam ser usadas para monitorar o alcance do sucesso do programa ao término do tratamento em massa, como também administrar uma vigilância que identifique qualquer reassunção potencial de transmissão. As monitorações da intensidade de transmissão em áreas endêmicas também poderão ser feitas através de métodos entomológicos, identificando a infecção filarial em mosquitos e provendo estimativas da intensidade de transmissão. No entanto, com o declínio de níveis de infecção, pode ficar mais difícil coletar número suficiente de mosquitos para se determinar, com confiança a ausência da infecção. Provendo uma medida cumulativa de exposição à infecção filarial, ensaios que mensurem anticorpos poderão evitar muitas das limitações de métodos, baseados na descoberta direta do parasita, seus antígenos ou seu DNA.

6. CONCLUSÕES

O extrato secretório e excretório de larvas infectantes de *Wuchereria bancrofti* (AgSE) apresentou, após separação eletroforética, bandas com valores de peso molecular relativo de 200, 175, 138, 105, 100, 76, 55, 49, 42, 39, 38, 32, 28 e 14 kDa.

Todas as bandas protéicas da composição do AgSE, exceto a de 175 kDa, foram reconhecidas pelos anticorpos dos dois grupos de comparação (portadores de filariose bancroftiana e endêmicos normais).

Comparando os grupos do estudo, o percentual de reconhecimento humoral pelo grupo dos endêmicos normais foi significativamente maior para todas as bandas protéicas do AgSE, exceto para a de 105 kDa.

As bandas protéicas que apresentaram maior percentual de reconhecimento humoral em ambos os grupos foram as de 49 e 55 kDa.

A diferença de maior significância entre os grupos foi percebida na banda de 200 kDa (52,3% nos endêmicos normais e 4,1% no grupo de portadores de filariose bancroftiana)

Dos testes diagnósticos utilizados o imunoenzimático (Og4C3) foi o que apresentou maior sensibilidade na identificação de portadores de filariose bancroftiana.

Embora os microfilarêmicos que participaram do estudo, 94% se enquadrem na faixa de baixa parasitemia (1 a 59 microfilárias por 20µl), esta carga parasitária, segundo a literatura, representa uma preocupação em saúde pública devido ao grande potencial de transmissão.

No grupo dos homens houve um maior número de diferenças significativas com relação ao reconhecimento humoral das bandas proteicas.

O padrão de reconhecimento entre homens e mulheres apresentou forte semelhança tanto nos portadores de filariose bancroftiana quanto nos endêmicos normais, embora com diferenças significativas de intensidade entre os grupos.

O grupo de endêmicos normais mostrou uma maior intensidade no reconhecimento à medida que a idade aumenta, o que não ocorre no grupo de portadores de filariose bancroftiana.

O reconhecimento da banda protéica de 200kDa se intensifica com o aumento da idade no grupo de endêmicos normais.

Aplicando a regressão logística para análise, permaneceram no modelo final a variável faixa etária, as proteínas com associações significativas de 200, 138, 76, 55, 38, 28 e 14 kDa e as proteínas de 42 e 32 kDa não significativas ao nível de confiança adotado.

Ficaram excluídas pela regressão logística no modelo “Backword” as bandas protéicas de 175, 105, 49, 100 e 39 kDa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISS, D. G. et al. Clinical Parasitologic and immunologic observations of patients with hydrocele and elephantiasis in an area with endemic lymphatic filariasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.755-758, 1995.

ALBUQUERQUE, C. M. R.; NEVES, J. C. M.; WERKHÄUSER, R. P. Obtainment of *Wuchereria bancrofti* infective larvae (L3) from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using an artificial feeding technique. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 593-595, 1992.

ALBUQUERQUE, M. F. M. et al. Bancroftian filariasis in two urban areas of Recife, Brazil: pre-control observations on infection and disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 89, p. 373-377, 1995.

ALBUQUERQUE, M. F. M. Urbanization, slums, and endemics: the production of filariasis in Recife, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.9, n.4, p.487-497. out./dez. 1993.

ALMEIDA, A. B. et al. The presence or absence of active infection, not clinical status, is most closely associated with cytokine responses in lymphatic filariasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.173, p.1453-1459, 1996.

ALMEIDA, A. B.; FREEDMAN, D. O. Epidemiology and immunopathology of bancroftian filariasis. **Microbes Infect.**, Paris, v.1, p.1015-1022, 1999.

AZEVEDO, R., DOBBIN, J. E. Filariose (*W. bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro de Afogados (Recife). **Publ. Avulsas Cent. Pesqui. Aggeu Magalhães**, Recife, v. 1, p. 157-162, 1952.

BAILEY, W. J. et al. Acquisition and expression of humoral reactivity to antigens of infective stages of filarial larvae. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.17, p.617-623, 1995.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, Londres, v. 5, n. 420p. 502-507, 2002.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia Brasília 1985.

BRABIN, L. Sex differences in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity. **J. Epidemiol. Infect.**, Chicago, v.105, p.335-353, 1990.

BRAGA, C. et al. Avaliação de indicador sócio-ambiental utilizado no rastreamento de áreas de transmissão de filariose linfática em espaços urbanos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1211-1218, set./out. 2001.

BRAGA, C. et al. Bancroftian filariasis in an endemic area of Brazil: differences between genders during puberty. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasilia, v. 38 n. 3, p. 224-228, May/Jun. 2005.

BRAUN, R. F. **Plano de trabalho para a eliminação da filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Brasil.** Secretaria Municipal de Saúde de Belém, Pará, impresso 2002. Mimeografado.

BURKOT, T. R.; KWAN-LIM, G. E.; MAIZELS, R. M. A novel 95-kilodalton antigen of *Wuchereria bancrofti* infective larvae identified by species-specific monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, n. 2, p. 485-488, Feb. 1996.

BURRI, H. et al. Skin changes in chronic lymphatic filariasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 90, p. 671-674, 1996.

CHANTEAU, S. et al. Diagnostic values of ELISA-IgG4 as compared to ELISA-IgG and indirect immuno-fluorescence for the routine diagnosis of Bancroftian filariasis in the South Pacific: application on capillary blood collected on filter paper. **Trop. Med. Parasitol.**, Stuttgart, v.42, p.339-342, 1991.

CHANTEAU, S. et al. *Wuchereria bancrofti* filariasis in French Polynesia: age-specific patterns of microfilaraemia, circulating antigen, specific IgG and IgG4 responses according to transmission level. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 25, p. 81-85, 1995.

CHENTHAMARAKSHAN, V.; REDDY, M. V.; HARINATH, B. C. Immunoprophylactic potential of a 120 kDa *Brugia malayi* adult antigen fraction, BmA-2, in lymphatic filariasis. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 277-285, Jun. 1995.

CONSOLI, R. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz 1994.

COX, F. E. G. Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem. **Parasitol. Today**, Cambridge, v.16, p.135, 2000.

DAS, P. K. et al. Towards elimination of lymphatic filariasis in India. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 457-460, 2001.

DAY, K. P. et al. Age specific patterns of change in the dynamics of *Wuchereria bancrofti* infection in Papua New Guinea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, n. 44 p. 518-527, 1990.

DAY, K. P.; GREGORY, W. F.; MAIZELS, R. M. Age-specific acquisition of immunity to infective larvae in a bancroftian filariasis endemic area of Papua New Guinea. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 13, p. 277-290, 1991.

DIMOCK, K. A.; EBERHARD, M. L.; LAMMIE, P. J. Th1-like antifilarial immune responses predominate in antigen-negative persons. **Infect. Immun.**, Washington, n. 64, p. 2962-2967, 1996.

DREYER, G. et al. Detection by ultrasound of living adult *Wuchereria bancrofti* in the female breast. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 95-96, 1996.

DREYER, G.; MEDEIROS, Z. Filariose linfática: ainda um desafio. **Ciênc. Hoje**, São Paulo, v. 12, n. 68, p. 6-7, 1990.

DUBE, A. et al. *Presbytis entellus*: a primate model for parasitic disease research. **Trends Parasitol.**, Oxford, Liverpool, v. 20, n. 8, p. 358-360, 2004.

EGWANG, T. G. et al. Elevated antifilarial IgG4 antibody levels in microfilaraemic and microfilaridermic Gabonese adults and children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 49, p. 135-142, 1993.

ESTAMBALE, B. B. A. et al. Bancroftian filariasis in Kwale district of Kenya 3. Quantitation of the IgE response in selected individuals from an endemic community. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 89, p. 287-295, 1995.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 4 Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n.6, p. 398-411, 1993.

FRANCO, O.; SILVA-LIMA, D. M. Alguns aspectos das atividades contra a filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, São Paulo, n. 19, p. 73-89, 1967.

FREEDMAN, D. O. Immune dynamics in the pathogenesis of human lymphatic filariasis. **Parasitol. Today**, Cambridge, v. 14, p. 229-234, 1998.

FREEDMAN, D. O.; NUTMAN, T. B.; OTTESEN, E. A. Protective Immunity in bancroftian filariasis selective recognition of a 43 kD larval stage by infection-free Individuals in an endemic area. **J. Clin. Invest.**, New York, n. 83, p. 14-22, 1989.

FUHRMAN, J. A. et al. Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, n. 5, p. 1548-1552, mar.1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Gerencia de endemias focais. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por vetores. **Programa de Eliminação da Filariose Linfática no Brasil, Brasília – DF-1997**. Brasília, MS, p.15, 1997.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por vetores. **Relatório da reunião de avaliação do Programa de Controle da Filariose Linfática no Brasil, Recife – PE – 2000**. Brasília, 2000.

HARLOW, E.; LANE, D. Immunoblotting. In: _____ **Antibodies**. A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988. p. 471-510.

HARNETT, W. et al. Production of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of adult male *Onchocerca gibsoni*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.83, n.2, p.316-319, Apr.1997.

HARTMANN, S. et al. A 41-kDa antigen of the rodent filaria *Acanthocheilonema viteae* with homologies to tropomyosin induces host-protective immune responses. **Parasitol. Res.**, Berlin, v.83, n.4, p.390-393, 1997.

HELMY, H. Human antibody responses to *Wuchereria bancrofti* infective larvae. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.22, p.89-96, 2000.

HISAEDA, H. [Immune regulation by malaria parasites] **Fukuoka Igaku Zasshi**. Fukuoka, v. 95, n. 5, p. 109-117, 2004.

HOSMER, D. M.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. New York: John Wiley & Sons; 1989.

HUSSAIN, R.; GROGL, M.; OTTESEN, E. A. IgG antibody subclasses in human filariasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.139, p.2794-2798, 1987.

IBGE - Censo de 2000. Diretoria de Geociências. Inventário de base operacional, Rio de Janeiro, 2001.

KAZURA, J. W. Ivermectin and human lymphatic filariasis. **Microb. Pathog.**, London, v.14, n.5, p.337-342, May. 1993.

KAZURA, J. W.; CICIRELLO, H.; FORSYTH, K. Differential recognition of a protective filarial antigen by antibodies from humans bancroftian filariasis **J. Clin. Invest.**, New York, v.77, p.1985-1992, 1986.

KING, C. L. et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 92, p.1667-1673, 1993.

KING, C. L. Human immune responses to lymphatic filariasis in Papua New Guinea. **Papua N. Guin. Med. J.**, Port Moresby, v. 3-4, n. 43, p. 203-212, Sep. /Dec, 2000.

KING, C. L; NUTMAN, T. B. Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Immunol. Today**, Cambridge, v.7, p.A54-A8, 1991.

KOURI, P., BASNUEVO, J. G. **Lecciones de parasitologia y medicina tropical**. 3.ed. La Habana: Muniz Hnos, 1949.

KUMAR, A. Human filariasis: infection rate as the uniform measurable criterion for filarial endemicity. **J. Commun. Dis.**, Delhi, v.28 n.3, p.163-167, Sep. 1996.

KUMARASWAMI, V. The clinical manifestations of the lymphatic filariasis. In NUTMAN, T. B. **Lymphatic Filariasis**. 1st ed. London: Imperial College Press; 2000. Cap. 4, p. 90-112.

KURNIAWAN, A. et al. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.150, p.3941-3950, 1993.

KWAN-LIM, G. E.; FORSYTH, K. P.; MAIZELS, R. M. Filarial specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. **J. Immunol.**, Baltimore, v.145, p.4298-4305, 1990.

LACERDA, N.; TAVARES, A.; DOURADO, H. In: NEVES, JAYME. **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 929-948.

LAEMMILI, E. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LALITHA, P. et al. Quantitative assesment of circulating antigens in human lymphatic filariasis: a field evaluation of monoclonal antibody-based ELISA using blood collected on filter strips. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v.3, p.41-45, 1998.

LAMMIE, P. J. et al. Heterogeneity in filarial-specific immune responsiveness among patients with lymphatic obstruction. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.167. p.1178-1183, 1993.

LANGE, A. M. et al., Induction of protective immunity against larval *Onchocerca volvulus* in a mouse model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.49, n.6, p.783-788, Dec.1993.

LAWRENCE, R. A. Immunity to filarial nematodes. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.12 p.33-44. Sep. 2001.

LÊ GOFF, L. et al. Interleukin-5 is essential for vaccine mediated immunity but not innate resistance to a filarial parasite. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, n.5, p.2513-2517, 2000.

LIMA, C. A. et al. Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.98 p.217-22. Mar. 2003.

LUCIUS, R. et al. *Acanthocheilonema vitae*: vaccination of jirds with irradiation-attenuated stage-3 larvae and with exported larvae antigen. **Exp. Parasitol.**, New York, v.73, n.2, p.184-196, 1991.

MACIEL, A. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 449-455, Jul./Aug. 1996.

MACIEL, A. et al. Estudo comparativo de áreas endêmicas de filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Goiânia, n.10,(2 suppl), p.301-319, 1994.

MAHANTY, S. et al. Stage-specific induction of cytokines regulates the immune response in lymphatic filariasis. **Exp. Parasitol.**, New York, v.84, p.282-290, 1996.

MAIZELS, R. M. et. al. T-cell activation and the balance of antibody isotypes in human lymphatic filariasis. **Parasitol. Today**, Cambridge, v.11, n.2, p.50-56, Feb.1995.

MAIZELS, R. M.; LAWRENCE, R. A. Immunological tolerance: the key feature in human filariasis. **Parasitol. Today**, Cambridge, v.7, p.271-276, 1991.

MAIZELS, R. M; DENHAM, D. A.; SUTANTO, I. Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi*: Analysis of vitro released components and detection of parasite products in vivo. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.17, p.277-278, 1985.

MICHAEL, E. et al. Mathematical modelling and the control of lymphatic filariasis. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v.4 n.4 p.223-234, Apr.2004.

MICHAEL, E. et al. Transmission intensity and the immunoepidemiology of bancroftiana filariasis in East Africa. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 23, n. 7, p.373-88, Jul. 2001.

MICHAEL, E. The population dynamics and epidemiology of lymphatic filariasis. In: NUTMAN, T. B. **Lymphatic Filariasis**, 1st ed. London: Imperial College Press; 2000. p. 41-82.

MICHAEL, E.; BUNDY, D. A.; GRENFELL, B. T. Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. **Parasitology**, London, v. 112, Pt. 4, p. 409-428, Apr. 1996.

MIRANDA, J. et al. Perfil protéico e reconhecimento antigênico de extratos de larvas infectantes (L3) de *Wuchereria bancrofti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 38 n. 1, p. 27-32, jan./fev. 2005.

MORE, S. J.; COPEMAN, D. B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis. **Trop. Med. Parasitol.**, Stuttgart, v. 41, p. 403-406, 1990.

MURTHY, P. K. et al. Longitudinal humoral immune responses of Indian leaf monkey (*Presbytis entellus*) to *Brugia malayi* infection. **Parasitology**, London, v. 119, p. 53-60, 1999.

NANDURI, J.; KAZURA, J. W. Clinical and laboratory aspects of filariasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, n.2 v.1, p.39-50, Jan.1989.

NICOLAS, L. et al. Filarial antibody responses in *Wuchereria bancrofti* transmission area are related to parasitological but not clinical status. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 21; p. 73-80, 1999.

NORÕES, J. et al. Occurrence of adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 90, p. 55-56, 1996.

NUTMAN, T. B. et al. Parasite-specific anergy in human filariasis: insights after analysis of parasite antigen-driven lymphokine production. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 79, p. 1516-1523, 1987.

NUTMAN, T. B. Lymphatic filariasis: new insights and prospects for control. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v.14, p.539-546, 2001.

NUTMAN, T. B. Protective immunity in lymphatic filariasis. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 68 n.2, p. 248-252, Feb. 1989.

OLIVEIRA, C. M. F. **Condições ambientais e dinâmica populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) em áreas urbanas do Recife e Olinda.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Centro de Ciências Biológicas, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife, 1996

OTTESEN, E. A. et al. A controlled trial of ivermectin and diethylcarbamazine in lymphatic filariasis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.19, n.322, p.1113-1117, Apr. 1990.

OTTESEN, E. A. et al. Endemic filariasis on a Pacific Island. II. Immunologic aspects: immunoglobulin, complement, and specific antifilarial IgG, IgM, and IgE antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 31 n. 5, p. 953-961. Sep. 1982.

OTTESEN, E. A. et al. Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 134, n. 4, p. 2707-2712, Apr. 1985.

OTTESEN, E. A. et al. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. **Bull. World. Health Organ.**, Geneve, v. 6, n. 75, p. 491-503, 1997.

OTTESEN, E. A. Filarial infections. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.7, n.3, p.619-633, Sep.1993.

OTTESEN, E. A. Filariasis now. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, n. 41, Supl., 3, p. 9-17, sep. 1989.

OTTESEN, E. A. Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. .78, p. 9-18, 1984.

OTTESEN, E. A. Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective. **Parasitology**, London, n. 104, p. S71-S79, 1992.

PAILY, K. et al. Longevity and migration of *Wuchereria bancrofti* infective larvae and their distribution pattern in relation to the resting and feeding behaviour of the vector mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 89, n. 1, p. 39-47, 1995.

PALMIERI, J. R. et al. Experimental infection of *Wuchereria bancrofti* in the silvered leaf monkey *Presbytis cristatus* Eschscholtz 1821. **J. Helminthol.**, London, n.56, p. 243-245, 1982.

PARAB, P. B. et al. Characterization of a monoclonal antibody against larvae of *Brugia malayi*. **Immunology**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 169-174. May, 1988.

PARTONO, F. The spectrum of disease in lymphatic filariasis. In: **Filariasis**: Ciba Foundation Symposium No. 127. Ed. by OTTESEN, E. A. New York; John Wiley and Sons, 1987.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. M. Superfamília filariodeia. In: PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 594-618.

PRASAD, G. B.; REDDY, M. V.; HARINATH, B. C. Detection of filarial antigen in immune complexes in Bancroftian filariasis by ELISA. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 78, p. 780-783, 1983.

RACHOU, R. G, FERREIRA, M. O.; LIMA, M. M. Inquérito de filariose bancroftiana em Florianópolis, Capital do Estado de Santa Catarina. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, n. 82, p. 721-725, 1954.

RACHOU, R. G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v.12, p.11-40, 1960.

RACHOU, R. G. et al. Inquérito epidemiológico de filariose bancroftiana em uma localidade de Santa Catarina, como fase preliminar de uma prova profilática. Constatação de transmissão extra-domiciliar por um vetor, *Aedes scapularis*. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, n.7, p.51-70, 1955.

RAGHAVAN, N. et al. Cloning and characterization of a potentially protective chitinase-like recombinant antigen from *Wuchereria bancrofti*. **Infect Immun.** Washington, v.62, p.1901-1908, 1994.

RAJAGOPALAN, P. K. et al. Bancroftian filariasis in Pondicherry, South India: 1. Pre-control epidemiology observations. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.103, p.685-692, 1989.

RAMAIAH, K. D. et al. The economic burden of lymphatic filariasis in India. **Parasitol. Today**, Cambridge, v.16, p.251-253, 2000.

RAVINDRAN, B. et al. Protective immunity in human lymphatic filariasis problems and prospects. **Med. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 192, n.1, p.41-46, Feb.2002.

RECIFE. Secretaria de Saúde. Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária. **Programa de Saúde Ambiental**: Subprograma Controle de filariose Linfática. Recife, 2002.

RECOMMENDATIONS of the International Task Force for Disease Eradication **MMWR Recomm. Rep.**, Atlanta, v. 42, rr. 16, p. 1-38, Dec. 1993.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2^a. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2002.

ROCHA, A. **Estudo imunológico da síndrome de eosinofilia pulmonar tropical causadas pela filária e outros helmintos**. 1995. 138p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995.

ROCHA, A. et al. Circulating filarial antigen (CFA) in the hydrocele fluid from individual living in a bancroftiana filariasis area – Recife-Brazil, detected by the monoclonal antibody Og4C3- assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.1, p. 101-105, 2004.

ROCHA, A. et al. Evaluation of the OG4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 1, p. 859-864, 1996.

SAHOO, P. K. et al. Bancroftian filariasis: prevalence of antigenemia and endemic normals in Orissa, Índia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 94, p. 515-517, 2000.

SASA, M. Human filariasis. **A global survey of epidemiology and control**. Tokio: University of Tokyo Press, 1976.

SELKIRK, M. E. et al. Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites. **Parasitology**, London, v. 91, S15 -S38, 1986

SELKIRK, M. E.; MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immunity and prospects for vaccination against filariasis. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 184, n. 2/3, p. 263-281, Feb. 1992.

SEMNANI, T. R.; NUTMAN, B. T. Toward an understanding of the interaction between filarial parasites and host antigen-presenting cells. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 201, p. 127-138, 2004.

SIMONSEN, P. E. et al. Bancroftian filariasis: the patterns of filarial-specific immunoglobulin G1 (IgG1), IgG4 and circulating antigens in an endemic community of northeastern Tanzania. **Am. J. of Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 55, p. 69-75, 1996.

SIMONSEN, P. E.; NIEMANN, L.; MEYROWITSCH, D. W. *Wuchereria bancrofti* in Tanzania: microfilarial periodicity and the effect of blood sampling time on microfilarial densities. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 2, p. 153-158, 1997.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** New York, v.150, p. 76 1985.

STEEL, C.; GUINEA, A.; OTTESEN, E. A. Evidence for protective immunity to Bancroftian filariasis in the Cook Islands. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 174, p. 598-605, 1996.

SURESH, S. et al. Ultrasonographic diagnosis of subclinical filariasis. **J. of Ultrasound in Medicine**, New York, n. 16, p. 45-49, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets; Procedure and some Applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TURNER, P. et al. A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott, and IgG4 assay and clinical signs in the diagnosis of bancroftiana filariasis. **Trop. Med. Parasitol.**, Stuttgart, v.44, p.45-48, 1993.

VANAMAIL, P. et al. Estimation of age-specific rates of acquisition and loss of *Wuchereria bancrofti* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 83, p. 689-693, 1989.

WEIL, G. J. et al. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 156, p. 350-355, 1987.

WEIL, G. J. et al. *Brugia malayi*: antibody responses to larval antigens in infected and immunized jirds. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 74, p. 315-323, 1992.

WEIL, G. J. et al. Parasite antigenemia without microfilaremia in bancroftian filariais. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 55, n. 3, p. 333-337, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic filariasis infection & disease: control strategies.** Report of a WHO/CTD/TDR Consultative Meeting held at the University Sains Malaysia, Penang, Malaysia, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic filariasis: the disease and its control.** Fifth report of the WHO Expert committee on filariasis. Geneva, 1992. (Technical reports series, n. 821)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preparing and Implementing a National Plan to Eliminate Lymphatic Filariasis: A guideline for Programme Managers.** Geneva, 2000. (Technical reports series WHO/CDS/CPE/CEE/2000.15).

YATES, J. A.; HIGAH, G. I. *Brugia malayi*: vaccination of jirds with Cobalt-attenuated infective stage larvae protects against homologous challenge. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 34, p. 1132-1137, 1985.

YAZDANBAKHS, M. et al. HLA and elephantiasis in lymphatic filariasis. **Hum. Immunol.**, New York, v. 44, p. 58-61, 1995.

YAZDANBAKHS, M. et al. T cell responsiveness correlates differentially with antibody isotypes levels in clinical and asymptomatic filariasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 167, p. 925-931, 1993.

ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C