

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Vanessa Normandio de Castro

**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO SANGUE PERIFÉRICO DE
INDIVÍDUOS COM CARGA PARASITÁRIA BAIXA NA INFECÇÃO PELO
*Schistosoma mansoni***

Belo Horizonte
2016

Vanessa Normandio de Castro

**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS NO SANGUE PERIFÉRICO DE
INDIVÍDUOS COM CARGA PARASITARIA BAIXA NA INFECÇÃO PELO
*Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Coorientador: Prof^ª Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Área de concentração: Helminologia

Belo Horizonte
2016

Vanessa Normandio de Castro

**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS NO SANGUE PERIFÉRICO DE
INDIVÍDUOS COM CARGA PARASITARIA BAIXA NA INFECÇÃO PELO
*Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger – UFMG (Orientador)

Prof. Dr^a. Cristina Toscano Fonseca- CPqRR/FioCruz (Banca Examinadora)

Prof. Dr^a. Lilian Lacerda Bueno- UFMG (Banca Examinadora)

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2016.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

*Dedico esse trabalho a Deus,
Ao meu eterno marido Saulo, que foi, é
e sempre será o meu porto seguro!
Ao Wilson Felinos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me manteve firme nas adversidades.

Ao meu esposo Saulo por ter me dado às orientações necessárias e as palavras de ânimo a cada dia, muito obrigado.

A minha mãe e meu pai que sempre me ajudaram com seus sábios conselhos, aos meus irmãos Ana Paula, João Paulo e Junior por toda a força prestada.

Minha eterna gratidão ao meu orientador Doutor Stefan Michael Geiger, por confiar a mim esse maravilhoso trabalho, que tem uma parte social e humana bastante importante. Pelo conhecimento, paciência e orientação. Essa trajetória que passamos foi muito importante para a minha formação pessoal e profissional.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Deborah Negrão-Corrêa, muito obrigada pelos experimentos feitos no laboratório, pela orientação, pela paciência e principalmente pelo conhecimento adquirido.

Aos alunos do laboratório de Helmintos Intestinais (Andressa, João Paulo, Roney, Francine, Valéria e Diogo) pelo companheirismo, aprendizado e amizade.

Aos alunos do laboratório de Imunologia de Helmintos (Samira, Vinicius, Jailza, Vanessa, João Marcelo, Laura, Michele), pelo companheirismo e por todo o aprendizado.

Aos meus melhores amigos e irmãos Samira, Vinícius, Elis e Daniela. Obrigado por tudo.

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Parasitologia, que me ofereceu todo o suporte necessário, para que esse trabalho se concretize.

À CAPES pela concessão da bolsa de fomento, responsável por minha dedicação exclusiva à pesquisa durante este trabalho. Ao Programa DECIT (Ministério de Saúde/ CNPq, Nº 404405/2012-6) – Pesquisa em Doenças Negligenciadas, o qual financiou parcialmente esse Projeto de Pesquisa.

As Equipes de Endemias e a Secretaria de Saúde de Januária, que foram peças fundamentais para o trabalho em campo que foi realizado na região.

A população de Brejo do Amparo, distrito de Januária, agradeço pelo convívio e o conhecimento da vida de cada morador, foi muito importante esse contato com a comunidade para entender perfeitamente os problemas na região e poder indiretamente ajuda-los. Fomos recebidos com muita satisfação por cada um dos moradores. O conhecimento adquirido não foi apenas acadêmico, mas um crescimento renovador como ser humano.

Ao laboratório de Esquistossomose da Fiocruz/René Rachou –MG, ao Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho e ao Áureo A. de Almeida pela realização do Método de Gradiente Salino. Tive a oportunidade de estar nas atividades de campo com Áureo para entender e conhecer melhor o método.

Ao laboratório de Genômica de Parasitos – UFMG, ao Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, ao Dr. Fernando Sergio Barbosa, Dr. Pedro H. Gazzinelli Guimarães, Dra. Mariana Santos Cardoso e a Doutoranda Ana Luiza Teixeira Silva, pelo conhecimento e auxílio.

Ao Laboratório de Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias – UFMG, a Prof. Dra. Mariângela Carneiro e Fernanda Magalhães pelos auxílios nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira, Vivian Favero e toda a equipe da PUC-RS, pela realização do método de Helmintex®.

A Todos que nos ajudaram nas atividades de campo Doutorando Frederico Gil, Fernando Sergio Barbosa, Luciana, Warllem, Marco Túlio, Catielle, Carla.

A secretaria de Pós-Graduação em Parasitologia em especial as secretárias Sibebe e Sumara que sempre mostraram grande capacidade em seu trabalho.

Ao senhor Neri pelos cafés e pela sua alegria, deixando os dias mais agradáveis.

Aos motoristas que nos acompanharam em Januária (Elídeo e Marlon).

A Turma da Roliça e a todos que de alguma forma fizeram parte dessa grande vitória.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença de curso crônico, sendo seu causador o parasito *Schistosoma mansoni*, e a exposição contínua e prolongada aos antígenos de *Schistosoma mansoni*, resulta em um desvio da resposta imune. O diagnóstico é realizado por meio do método de Kato-Katz, porém, o método apresenta pouca acurácia em áreas de baixa endêmicidade. Levando-se em conta tais fatores, o objetivo do presente trabalho é caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas e buscar marcadores imunológicos da infecção, que indiquem a presença do *Schistosoma mansoni* em indivíduos com carga parasitária extremamente baixa, que obtiveram positividade para esquistossomose nos métodos de Gradiente Salino e/ou Helmintex®, comparando-os com indivíduos positivos no método de Kato-Katz e indivíduos, que por vezes foram diagnosticados, negativos nos testes parasitológicos de fezes. No Norte de Minas Gerais, Município de Januária, 197 moradores da zona rural de Brejo do Amparo foram examinados por diferentes métodos parasitológicos. Dentre esses indivíduos, foram obtidas amostras de sangue de 174 moradores para a avaliação de marcadores imunológicos. Foram dosados por ELISA, marcadores imunológicos tipo 1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-27, CXCL10), marcadores tipo 2 (CCL11, CCL17, IL-5 e IL-13) marcadores Th17 (IL-17) e de regulação (IL-10). Os resultados mostraram que no pré-tratamento, indivíduos com carga parasitária extremamente baixa apresentaram concentrações elevadas do marcador tipo 1, IL-6 no sangue periférico, mostrando que o grupo possui um processo inflamatório ativo. Quimiocinas como marcadores de resposta imune do tipo 1 (CXCL10) ou do tipo 2 (CCL11 e CCL17), foram detectadas indiferentemente nos quatro grupos analisados, indicando que não há explícita modulação da resposta no sangue periférico. O marcador regulatório IL-10 apresentou concentração mínima e indiferença entre os grupos. Em relação ao pós-tratamento, observou-se apenas o aumento da quimiocina CCL11, com diferença significativa, em todos os grupos analisados. Em geral, indivíduos infectados apresentaram uma tendência de diminuição de marcadores de inflamação do tipo 1 e um aumento de marcadores do tipo 2, que poderiam ser benéficos em caso de reinfecção.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*; carga parasitária baixa; marcadores imunológicos; citocinas; quimiocinas.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a chronic disease and the prolonged and continuous exposure to *Schistosoma mansoni* antigens results in a deviation of the immune response. For the diagnosis in low endemicity areas, the Kato-Katz method is commonly applied, however, this method has low accuracy. This study aimed to characterize the cytokine and chemokine profile in individuals with extremely low parasite load, who were diagnosed positive with the saline gradient and/or Helmintex[®] methods, and compare the immunological profile with individuals diagnosed by the Kato-Katz method and with individuals repetitively negative by different stool exams. In the Municipality of Januária, Northern Minas Gerais, 197 residents from the rural area of Brejo do Amparo were examined by different parasitological methods. Among these individuals, blood samples of 174 residents were obtained for assessment of immunological markers, using commercially available sandwich ELISAs for the following markers: type 1 immune response (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-27, CXCL10), type 2 (CCL11, CCL17, IL-5 and IL-13), inflammatory Th17 (IL-17) and regulatory response (IL-10). The results showed that before treatment, individuals with extremely low parasitic load exhibited elevated concentrations of the type 1 marker IL-6 in the peripheral blood, indicating an active inflammatory process in this group. Chemokines, such as type 1 (CXCL10) or type 2 (CCL11 and CCL17) immune response markers were detected indifferently in the four analyzed groups. Therefore, an explicit immune modulation was not observed in the peripheral blood. Also, the concentrations of IL-10 as a regulatory marker were minimal and indifferent among groups. At post-treatment, an increase in CCL11 chemokine concentration was observed in all groups, when compared with pre-treatment levels. In general, infected individuals presented a tendency to decrease the type 1 inflammation markers after treatment and increase type 2 markers, which could be beneficial in case of reinfection.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; low parasite load; immunological markers; cytokines; chemokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global da Esquistossomose.....	18
Figura 2 – Regiões endêmicas para a Esquistossomose mansônica.....	20
Figura 3 - Regiões endêmicas para a Esquistossomose mansônica.....	20
Figura 4 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 5 – Interação parasito-hospedeiro no sistema imunológico, perante infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 6 – Localização do município de Januária, Minas Gerais.....	35
Figura 7 – A e B o córrego Tocantins, Brejo do Amparo, principal veículo de transmissão da esquistossomose na região.....	36
Figura 8- Detalhamento do Tempo zero (pré- tratamento).....	38
Figura 9- Detalhamento do Tempo 3 meses (pós-tratamento).....	39
Figura 10 – Kit Helm test, método de Kato-Katz.....	40
Figura 11 – Equipamento usado no método de Gradiente Salino.....	43
Figura 12 – Método ELISA sanduíche.....	45
Figura 13 – Distribuição da intensidade da infecção por <i>S. mansoni</i> por faixa etária na comunidade rural do Distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária, Norte de Minas Gerais.....	48
Figura 14 – Prevalência por faixa etária em indivíduos infectados com <i>S. mansoni</i> e classificados como ≥ 4 opg e < 4 opg.....	49
Figura 15 – Concentrações de citocinas e quimiocinas séricas (pg/ml), indicadas em escala logarítmica (log 10), em soros de indivíduos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> no Tempo zero.....	50
Figura 16 - Concentrações de quimiocinas (pg/ml) em comparação com a faixa etária, indicadas em escala logarítmica (log 10), em soros de 149 indivíduos.....	52
Figura 17– Concentrações de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos (mm^3), nos grupos < 4 opg, 4 a 99 opg e ≥ 100 opg e Negativos.....	56
Figura 18 – Associação entre a concentração de eosinófilos ($0\text{-}500 \text{ mm}^3$) com a contagem de ovos por grama de fezes (opg), nos Grupos com 4 a 99 opg e ≥ 100 opg.....	57
Figura 19 – Comparação nas concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/ml) na escala logarítmica (log 10) no Tempo zero (pré- tratamento) e Tempo 3 meses (pós – tratamento), no grupo < 4 opg.....	58

Figura 20 – Comparação nas concentrações sérica de citocinas e quimiocina (pg/ml) com escala de(log 10) no Tempo zero e Tempo 3 meses pós-tratamento no grupo 4 a 99 opg.....60

Figura 21 – Comparação nas concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/ml) com escala de (log10) no Tempo zero pré-tratamento e Tempo 3 meses pós-tratamento no grupo ≥ 100 opg.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da intensidade da infecção por <i>S. mansoni</i> , através da contagem dos ovos em duas lamínas montadas pelo método de Kato-Katz.....	21
Tabela 2 - Caracterização dos quatro < 4 opg, 4 a 99 opg, ≥ 100 opg e Negativos com o total de n = 174 indivíduos.....	47
Tabela 3 – Porcentagens de indivíduos respondedores e não respondedores, analisados por medianas das concentrações de cada citocinas e quimiocinas (pg/ml).....	53
Tabela 4 – Correlação entre marcadores (citocinas e quimiocinas) e intensidade da infecção (opg) de 4 a 99 e ≥ 100.....	54
Tabela 5 – Correlação entre as citocinas e quimiocinas (pg/ml) no grupo < 4 opg.....	54
Tabela 6 – Correlação entre citocinas e quimiocinas (pg/ml) no grupo 4 a 99 opg.....	55
Tabela7– Correlação entre citocinas e quimiocinas (pg/ml) no grupo dos negativos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs – Células apresentadoras de antígenos - (*Antigen Presenting Cell*).
- BSA – Albumina de soro bovino - (*Bovine serum albumin*).
- CCL24 – Quimiocina eotaxina-2 e recrutamento de eosinófilos.
- CCR2 – Receptor de quimiocinas para migração de linfócitos T, monócitos, basófilos, eosinófilos e células dendríticas.
- CCR3 – Receptor de quimiocinas para migração de eosinófilos, basófilos e mastócitos, linfócitos T.
- CCR5 – Receptor de quimiocinas para migração de linfócitos Th1, NK, células dendríticas e monócitos.
- CDs – Células dendríticas - (*dendritic cell*).
- EDTA – Etilenodiaminotetracético - (*Ethylenediamine tetraacetic acid*).
- ELISA – Teste imunoenzimático - (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).
- EPF – Exame parasitológico de fezes.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde.
- HSCs – Células estreladas hepáticas - (*Hepatic Stellate Cells*).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IgE – Imunoglobulina E.
- IgG – Imunoglobulina G.
- IL – Interleucina .
- IFN- γ - Interferon gama.
- K-K – Kato-Katz.
- MHC II – complexo de Histocompatibilidade do tipo II - (*major histocompatibility complex type 2*).
- NK – Célula Natural Killer - (*natural killer cells*).
- PBMC – Células mononucleares do sangue periférico - (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*).
- PBS – Tampão Fosfato Salínico - (*Phosphate-buffered saline*).
- PCE – Programa de Controle da Esquistossomose.
- RPM – Rotação por minuto.
- SEA – Antígenos solúveis dos ovos de *Schistosoma mansoni* - (*soluble egg antigen*).
- TGF-beta – Fator de transformação de crescimento - (*Transforming growth factor- β*)
- UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais .
- Th1 – Células TCD4⁺ auxiliaadoras tipo 1 - (*T helper cells type 1*).

Th2 – Células TCD4⁺ auxiliaadoras tipo 2 - (*T helper cells type 2*).

Th17 – Células TCD4⁺ auxiliaadoras do tipo 17 - (*T helper cells type 17*).

Treg – Células TCD4⁺ designadas regulatórias - (*Regulatory T cells*).

TNF – α Fator de Necrose Tumoral alfa - (*Tumor necrosis factor α*).

OPG – Ovos por grama de fezes.

WHO – Organização Mundial da Saúde - (*World Health Organization*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Esquistossomose no mundo	17
1.2. Esquistossomose no Brasil	18
1.3. Ciclo biológico.....	22
1.4. Patologia no hospedeiro definitivo	25
1.4.1. Resposta imune na infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	26
1.4.2. Resposta imune de indivíduos que vivem em áreas endêmicas para a esquistossomose	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Geral	34
3.2. Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 População e área de estudo	35
4.2 Considerações éticas	36
4.3 Obtenção de material biológico e métodos de diagnóstico para esquistossomose	37
4.4 Métodos parasitológicos de fezes	40
4.4.1 Kato-Katz: Kato (1954) modificado por Katz et al. (1972)	40
4.4.2 Helmintex® (Teixeira et al., 2007)	41
4.4.3 Gradiente Salino (Coelho et al., 2009).....	42
4.5 Dosagem de citocinas e quimiocinas no sangue periférico	43
4.6 Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Classificação da população com exames parasitológicos de fezes no tempo zero	46
5.2 Perfil de citocinas e quimiocinas no sangue periférico em indivíduos infectados com <i>S. mansoni</i> – Tempo zero.....	49
5.3 Correlação entre intensidade da infecção por <i>S. mansoni</i> e marcadores imunológicos e hematológico no tempo zero.....	53
5.4 Seguimento do estudo: comparação de marcadores imunológicos do tempo zero com Tempo 3 meses pós-tratamento	57
6. DISCUSSÃO	64

7. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	84
ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP.....	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose no mundo

A Esquistossomose é uma doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo considerada uma doença de curso crônico, que acomete mais de 200 milhões de pessoas pelo mundo, sendo encontrada em 78 países, distribuídos no continente Americano, na América do Sul e do Norte (ocorrendo especificamente na Região do Caribe), no continente Africano e Asiático. Aproximadamente 85% dos casos são encontrados no continente Africano, principalmente na Região Subsaariana (Taylor *et al.*, 2006).

Nas áreas chamadas de regiões tropicais e subtropicais são encontradas seis espécies de *Schistosoma*: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma malayensis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma haematobium* (Noya *et al.*, 2015). Das espécies citadas acima, três possuem importância epidemiológica, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*.

A espécie *Schistosoma haematobium*, é causador da doença esquistossomose urogenital, cujo parasito está localizado nos ramos pélvicos do plexo venoso da bexiga de seu hospedeiro definitivo, os ovos são eliminados pela urina, levando assim, à lesões do tecido, tornando a urina sanguinolenta. É um parasito encontrado no território Africano, nas regiões do Egito e no Oriente Médio. O hospedeiro intermediário é o molusco do gênero *Bulinus* (Chitsulo *et al.*, 2000; Gryseels *et al.*, 2006). A espécie *Schistosoma japonicum*, causa a doença esquistossomose asiática, cujo o verme adulto, está localizado no sistema porta hepático e seus ovos são eliminados nas fezes. O parasito é encontrado no Continente Asiático, tendo como hospedeiro intermediário o molusco do gênero *Oncomelania* (Gryseels *et al.*, 2006). Já espécie *Schistosoma mansoni*, foco do estudo, é encontrado na América do Sul, na Região do Caribe na América do Norte, e no Continente Africano, sendo a única espécie encontrada no Brasil. No hospedeiro definitivo os vermes adultos localizam-se no sistema porta- hepático, onde acontece o acasalamento com subsequente migração dos vermes adultos para as veias mesentéricas inferiores, onde ocorre a eliminação dos ovos, que chegam ao ambiente externo junto à excreção fecal. Seu hospedeiro intermediário é o molusco do gênero *Biomphalaria* (Gryseels *et al.*, 2006). As outras espécies de *Schistosoma*, apresentam transmissão associada a focos limitados, sendo assim, há menor importância epidemiológica. A distribuição global da esquistossomose está exposta na figura 1. (WHO, 2002; Van Der Werf *et al.*, 2003; Weerakoon *et al.*, 2015).

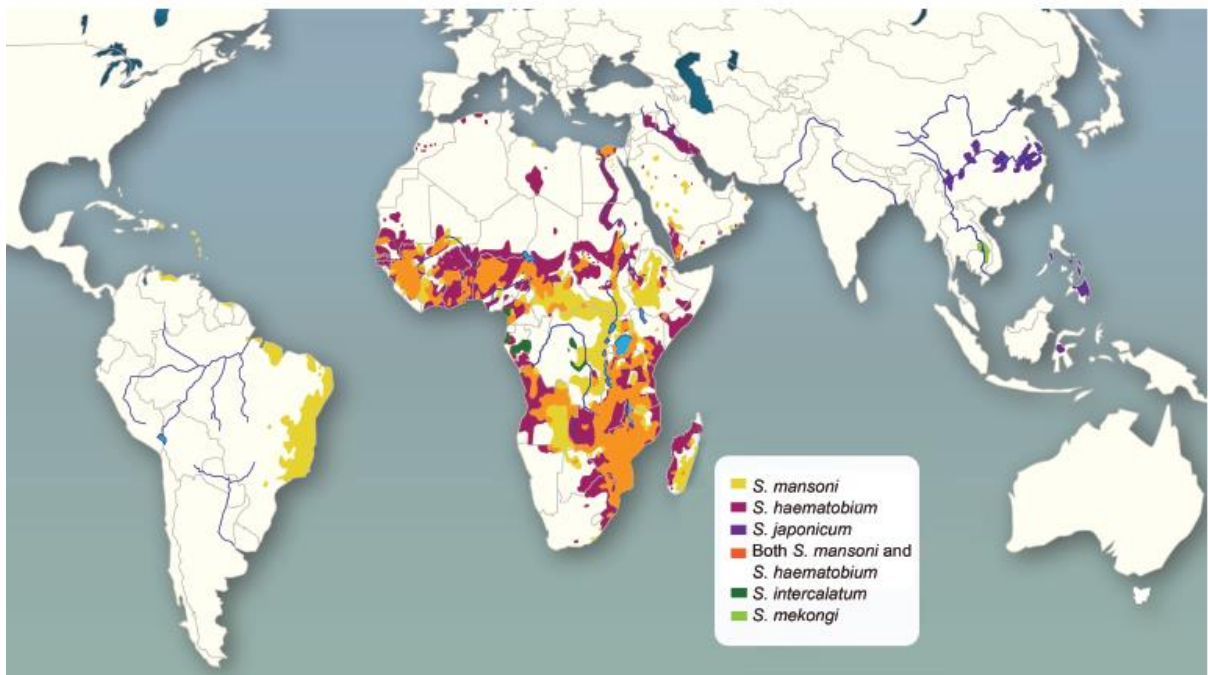


Figura 1 – Distribuição global da Esquistossomose
Fonte: Weerakoon et al. (2015)

1.2. Esquistossomose no Brasil

A esquistossomose foi introduzida na América no período colonial entre os anos de 1550 e 1850, por conta da entrada de imigrantes e o tráfico de escravos africanos infectados com o *Schistosoma mansoni*. As condições ambientais favoráveis e a susceptibilidade de alguns planorbídeos ao parasito, foi fundamental para a instalação da doença no Brasil (Morgan et al., 2001).

No Brasil, a esquistossomose é um problema de saúde pública, com aproximadamente 25 milhões de pessoas, vivendo em áreas de risco de infecção (Ministério da Saúde, 2014) e com estimativas de 1,5 milhões de pessoas infectadas (Noya et al., 2015).

Vários fatores contribuem para a expansão da esquistossomose no Brasil: o clima tropical (condição ideal para a transmissão da doença), a falta de saneamento básico (que levam os dejetos do hospedeiro definitivo a serem eliminados *in natura* no meio ambiente), contaminação dos criadouros de caramujos por dejetos do hospedeiro definitivo, contendo ovos do parasito, resistência dos caramujos as condições ambientais adversas, insciência das populações que vivem em áreas de riscos quanto ao parasito e a sua profilaxia (falta de educação sanitária), migrações internas de pessoas que vivem em áreas endêmicas para áreas isentas da doença levando a manutenção da esquistossomose (Ministério da Saúde, 2014).

Um dos principais avanços no controle da esquistossomose na década de 1980, foi à implementação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) no Brasil, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2002), contendo ações de diagnóstico, promoção da educação para a saúde e tratamento de pessoas infectadas, com o uso de métodos estratégicos, com exames parasitológicos de fezes e posterior tratamento quimioterápico individual ou em massa com o praziquantel (Ministério da Saúde, 2010). O praziquantel é o remédio de escolha para tratamento contra o *S.mansoni* e outros helmintos, o mecanismo de defesa do quimioterápico é a paralisação dos vermes por inibição dos canais de cálcio, lesões no tegumento e atua também no sistema excretor do parasito (Oliveira *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2010).

Segundo WHO (2012), as estratégias de controle são dependentes da prevalência da esquistossomose mansônica em cada área (2012), sendo as áreas categorizadas de acordo com as seguintes prevalências: de alto risco, de risco moderado e de baixo risco. Áreas de alto risco apresentam prevalência $\geq 50\%$, sendo a estratégia de controle o tratamento de toda a população em risco. Áreas de risco moderado apresentam uma prevalência $\geq 20\%$ e $<50\%$, com uma estratégia de ação voltada para o tratamento de todas as crianças em idade escolar, ocorrendo o tratamento periódico de dois em dois anos, além de realizar tratamento dos adultos em risco. Já as áreas de baixo risco possuem prevalência $< 10\%$, com uma estratégia de controle voltada para o tratamento de todos os pacientes positivos.

No Brasil, as estratégias de controle visam o tratamento, apenas, dos casos constatados positivos por meio dos exames parasitológicos de fezes. Com isso, o programa pretende minimizar a mortalidade e a morbidade da população acometida pela doença, impedindo que os indivíduos sofram com patologias graves, acarretando um controle efetivo e integrado, com monitoramento por meio de levantamentos epidemiológicos, para determinar as áreas de risco e de intervenções dos órgãos públicos (Ministério da Saúde, 2012).

A partir desse cenário, o panorama da esquistossomose mansônica no Brasil mudou. O mapa da FUNASA (Brasil, 2002) representava vastas áreas de alta a média endemicidade (Figura 2). Com o passar dos anos, foram observadas a diminuição das áreas de alta e média endemicidade, com o aumento das áreas de baixa endemicidade (Brasil, 2014). Com isso, as principais regiões brasileiras, atualmente afetadas pela esquistossomose mansônica são o Nordeste e o Sudeste, respectivamente com os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Ceará, Maranhão, Espírito Santo e Minas Gerais, ocorrendo apenas alguns focos no Rio de Janeiro e em São Paulo (Figura 3). Mas, com as mudanças epidemiológicas da

esquistossomose mansônica, novos problemas surgiram. Pois, o tratamento em massa da população, levou ao aumento de indivíduos com carga parasitária baixa e/ou extremamente baixa.

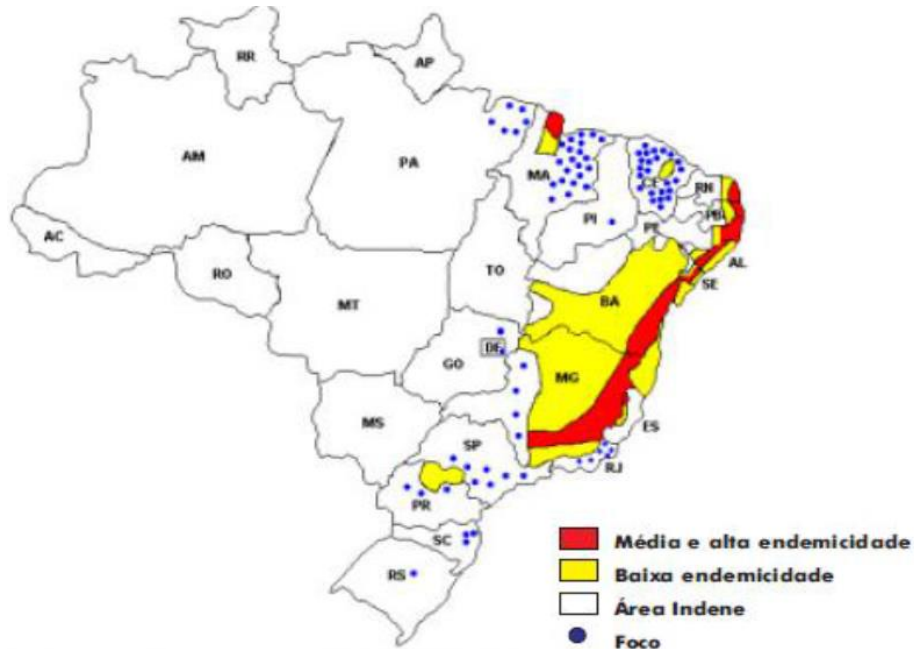


Figura 2 – Regiões endêmicas para a Esquistossomose mansônica.
Fonte: Funasa, 2002.

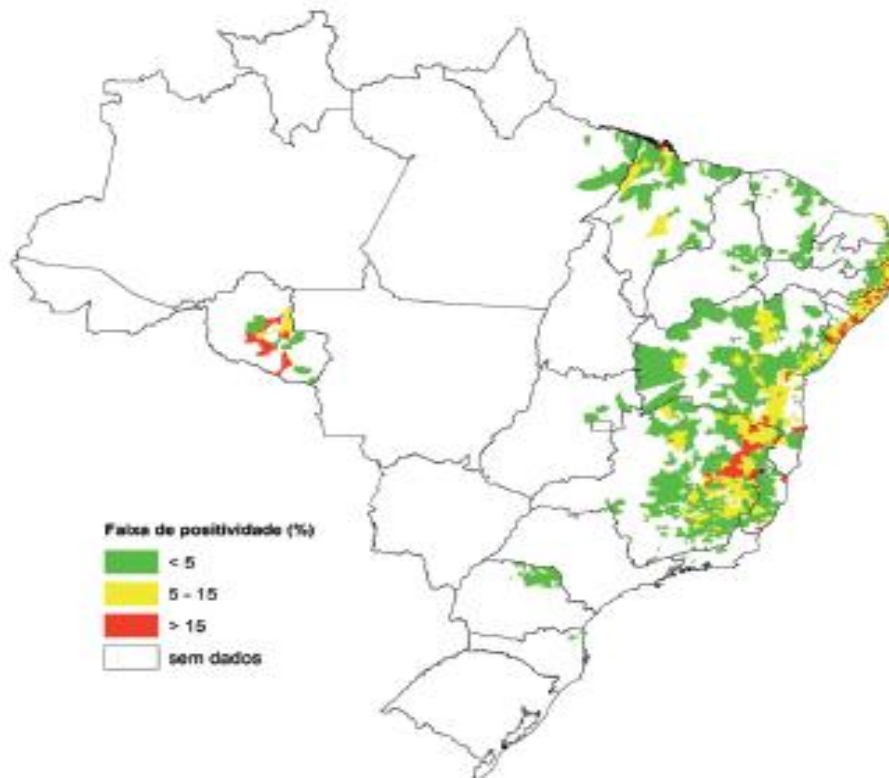


Figura 3 - Regiões endêmicas para a Esquistossomose mansônica.
Fonte: Programa de Vigilância e controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS. 2014.

Para o diagnóstico da população com esquistossomose mansônica o exame parasitológico de fezes, recomendado pela OMS (WHO, 2009), é o método de Kato-Katz, pois ele detecta não apenas a esquistossomose como geohelminhos (Katz *et al.*, 1972). O método é amplamente usado em estudos epidemiológicos, caracterizado pela quantificação de ovos por grama de fezes (Tabela 1). O método de Kato-Katz tem acurácia quantitativa (contagem do número de ovos existentes por grama de fezes) e qualitativa (a presença de um ovo, torna o paciente positivo para a doença), método rápido, barato e de fácil execução (Katz *et al.*, 1972). Porém, a OMS alerta que, áreas de baixa endemicidade e indivíduos com carga parasitária menor que 100 ovos por gramas de fezes, levam o método de Kato-Katz a apresentar uma sensibilidade reduzida com acurácia insuficiente para o diagnóstico desses indivíduos e análises não fidedignas de indivíduos de casos de controle de cura e pós-tratamento (WHO, 2009; Utzinger *et al.*, 2011). Com isso, para avançar no controle da esquistossomose mansônica é necessário o uso de métodos alternativos, que demonstrem maior sensibilidade nessas áreas de baixa endemicidade, caracterizadas por uma população de carga parasitária baixa, levando assim, a exposição da real prevalência da área (Grenfell *et al.*, 2013)

Tabela 1 – Classificação da intensidade da infecção por *S. mansoni*, através da contagem dos ovos em duas lâminas montadas pelo método de Kato-Katz.

Intensidade da infecção	Número de ovos <i>S. mansoni</i> eliminados por grama de fezes
Leve	1 a 99
Moderada	100 a 399
Intensa	>400

Fonte: adaptado de WHO (2002)

Uma das alternativas para aumentar a acurácia diagnóstica do método de Kato-Katz, no diagnóstico de indivíduos com carga parasitária baixa, é o aumento da quantidade de lâminas examinadas, e a utilização simultânea de vários métodos auxiliares como: outros métodos parasitológicos, métodos sorológicos, métodos moleculares e métodos de imagem, acarretando assim a melhora do desempenho diagnóstico em regiões de baixa endemicidade, controlando-se a morbidade e detectando as infecções precoces (WHO, 2008; Coelho *et al.*, 2009).

Uma das alternativas mais usadas como método parasitológico qualitativo é a sedimentação espontânea proposta por Lutz (1919) e modificada por Hoffman *et al.* (1934).

Outros métodos parasitológicos mais sensíveis foram descritos recentemente, o método de Gradiente Salino, que faz a separação dos ovos de helmintos por purificação em gradiente crescente com solução de salina (Coelho *et al.*, 2009) ou separação dos ovos das amostras fecais por esferas paramagnéticas, chamado método de Helmintex[®] (Teixeira *et al.*, 2007). Alternativas em métodos moleculares existem na detecção de DNA do parasito em amostras fecais (Oliveira *et al.*, 2006) ou métodos sorológicos, mais recentemente pesquisado e analisado por Van Dam e colaboradores (2004), o Teste rápido de Urina (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul) é um método qualitativo que detecta a presença de antígenos (proteoglicanos) do parasito *S. mansoni*. É usado também para detectar as infecções ativas pelo *S. haematobium* e o *S. japonicum* (Sousa-Figueiredo *et al.*, 2013). É uma técnica que deve ser avaliada e estudada para a sua aplicabilidade no diagnóstico da esquistossomose em vários países endêmicos, principalmente em áreas de baixa endemicidade (Rabello, 1997; Legesse & Erko, 2007; Gryseels, 2012). Por fim, métodos indiretos como a busca de anticorpos e antígenos circulantes (Jones *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2013) ou marcadores imunológicos (Geiger *et al.*, 2013), poderiam auxiliar no diagnóstico mais sensíveis e confiáveis.

Em adição a esses métodos, na atualidade, a morbidade relacionada à hepatoesplenomegalia, tem como principal forma diagnóstica a avaliação ultrassonográfica, que mostra a real modificação dos órgãos acometidos pelas fibroses provocadas no acúmulo de ovos de *S. mansoni* nos tecidos (Lambertucci *et al.*, 2000).

Com métodos de diagnóstico cada vez mais sensíveis, confiáveis e precisos, indivíduos com carga parasitária baixa entre outros acometimentos seriam diagnosticados e tratados mais rapidamente, aumentando a cura da doença, melhorando a vida dos pacientes e o avanço no controle da esquistossomose mansônica (Kure *et al.*, 2015).

1.3. Ciclo biológico

S. mansoni é um platelminto, dioico, com um dimorfismo sexual nítido, sua fêmea é maior que o macho que possui uma abertura ventral, o chamado canal ginecóforo, onde a fêmea é alojada. O parasito possui vários estágios de evolução (ovos, miracídeos, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos machos e fêmeas) (Souza *et al.*, 2011), sendo caracterizado, cada um desses estágios, por uma morfologia e fisiologia diferente, garantindo o sucesso do parasito em sua transmissão e infectividade de hospedeiros intermediários e definitivo (Siqueira-Batista *et al.*, 1998).

O Ciclo biológico da esquistossomose mansônica (Figura 4) é bastante complexo, pois o parasito tem como característica adaptabilidade ao meio ambiente, ao hospedeiro intermediário e ao hospedeiro definitivo. No Brasil, seu hospedeiro intermediário é o caramujo do gênero *Biomphalaria*, sendo encontradas várias espécies, mas as principais espécies transmissoras da esquistossomose para o homem são: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. A *B. glabrata* é a mais importante dos hospedeiros intermediários, devido a sua ampla distribuição geográfica e maior susceptibilidade ao parasito *Schistosoma mansoni*, resultando assim, em um papel importante na transmissão da esquistossomose, pois, em áreas endêmicas a presença de criadouros de *B. glabrata*, foram associadas a infecção pelo *S. mansoni*, mostrando a sua real importância no ciclo biológico do parasito e na transmissão da esquistossomose (Guimarães *et al.*, 2010).

No hospedeiro definitivo, os vermes adultos, machos e fêmeas, são encontrados no sistema vascular, em específico nas veias mesentéricas inferiores. Os ovos eliminados pelas fêmeas são carregados e atravessam o endotélio da mucosa intestinal e atingem a luz intestinal por volta de seis dias, tempo necessário para sua maturação, o atravessar dos ovos no endotélio da mucosa intestinal acarreta no organismo uma reação inflamatória (Wynn *et al.*, 2004). Alguns ovos ficam retidos nos tecidos, na mucosa intestinal ou podem ser arrastados para o fígado. Esses ovos podem embolizar e provocar inflamações, alterações morfofisiológicas e morbidades no hospedeiro definitivo. Os ovos que conseguem chegar à luz intestinal chegam ao exterior agregado ao bolo fecal. No meio ambiente ao entrar em contato com fontes hídricas, como rios e lagos, sofrem influência da baixa osmolaridade, estímulos luminosos e a temperatura, o que provoca o movimento do miracídio dentro do ovo e sua ruptura com a eclosão do miracídio. Esse miracídio é infectante ao hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Com a ajuda de estímulos químicos e a interação quimiotática, o miracídio penetra no molusco, onde ocorre seu ciclo assexuado, dando origem aos esporocistos I, II e III, que são um conjunto de células reprodutivas, que darão origem a centenas e milhares de cercárias. O ciclo de vida no molusco, com a reprodução assexuada até a liberação das cercárias, demora de 4 a 6 semanas, com posterior saída das cercárias, que são infectantes ao seu hospedeiro definitivo, ocorrendo a infecção por penetração ativa na pele ou mucosa (Colley *et al.*, 2014).

Ao penetrar na pele do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda, ocorrendo uma mudança morfológica no parasito, dando origem aos esquistossômulos, que migram pelo tecido subcutâneo até encontrar os vasos sanguíneos. Já na circulação, os esquistossômulos são carregados pelo fluxo sanguíneo venoso, chegando nos pulmões e posteriormente, se

encaminham para o sistema porta hepático, onde os esquistossômulos completam seu desenvolvimento. Após um período de 5 a 7 semanas, os esquistossômulos se transformam em vermes adultos (machos e fêmeas), que se acasalam e migram para as veias mesentéricas inferiores (Colley *et al.*, 2014).

O parasito adulto pode chegar a viver em seu hospedeiro definitivo, em média 5 anos, embora, haja casos na literatura que descrevam casais de vermes que viveram até 30 anos em seu hospedeiro definitivo, acasalando e eliminando ovos, sendo que a postura desses ovos recebe a interferência pela idade dos vermes adultos, onde fêmeas com até 2 anos de idade, tem a capacidade de liberar aproximadamente 300 ovos por dia nos capilares e vênulas, mas apenas 50% dos ovos eliminados chegam ao meio ambiente (Souza *et al.*, 2011).

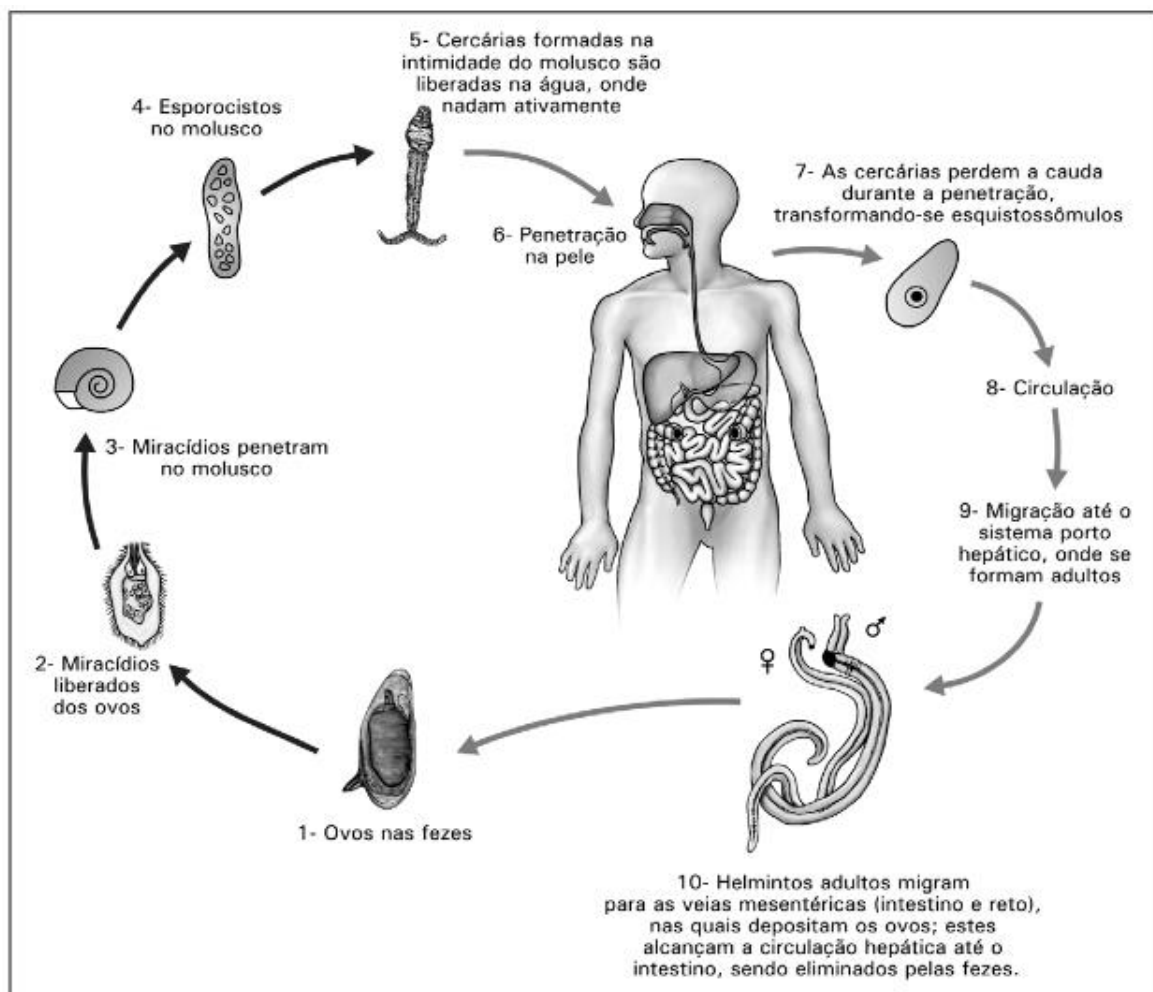


Figura 4 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

Fonte: Souza *et al.* (2011)

1.4. Patologia no hospedeiro definitivo

A esquistossomose e a evolução da doença estão relacionadas a fatores do hospedeiro: idade do paciente, genética, sistema imunológico e estado nutricional. Além de fatores relacionados ao parasito, tais como; cepa, idade do parasito e carga parasitária. A exposição e a intensidade da infecção nos hospedeiros definitivos também são importantes para compreender o desenvolvimento da doença (Silveira *et al.*, 2004).

Durante a infecção pelo *S. mansoni*, podem ser observadas fases clínicas distintas: fase aguda e a fase crônica, que se divide em três alterações morfofisiológicas dos órgãos acometidos (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica).

Durante a fase aguda pode ocorrer uma dermatite cercariana, resposta de hipersensibilidade mediada por IgE, durante a penetração das cercárias e migração dos esquistossômulos. A dermatite localizada, não é muito encontrada em indivíduos de áreas endêmicas, pelo frequente contato e exposição ao parasito, mas são comuns em visitantes de áreas endêmicas e imigrantes. Durante a fase aguda há duas etapas: a fase pré-postural, que ocorre cerca de 10-30 dias após a infecção é uma fase com sintomatologia variada. Há pacientes assintomáticos e pacientes que possuem sintomas sistêmicos inespecíficos, como febre, mialgia, calafrios, astenia, mal-estar, dor de cabeça, aumento do fígado, etc. Essas sintomatologias podem ser causadas, pela destruição dos esquistossômulos pelo sistema imune (Gryseels *et al.*, 2006).

Em seguida, a fase postural, caracterizada pela produção e maturação dos ovos, causando as variadas apresentações clínicas da fase aguda. Também chamada de fase toxêmica, devido à disseminação dos ovos no intestino, provocando necroses e a formação dos granulomas, devido aos antígenos solúveis dos ovos. Essa fase inicia-se em torno de 50 dias após infecção e pode durar até 120 dias após infecção. No sangue periférico ocorre uma leucocitose moderada e um aumento significativo de eosinófilos. O baço se torna palpável, devido à hiperplasia linfóide intensa (Carvalho *et al.*, 2008).

As patologias discutidas acima são de indivíduos expostos ao parasito pela primeira vez, já que em indivíduos residentes de áreas endêmicas nem sempre são observados, os aspectos clínicos da fase aguda e os sinais e sintomas são inespecíficos e parecidos com outras doenças infecciosas (Neves, 1986; Prata, 1997; Barbosa *et al.*, 2001).

A fase crônica é caracterizada, pela diminuição dos granulomas que é uma reação inflamatória contra os ovos de *S. mansoni* depositados nos diferentes órgãos do seu hospedeiro vertebrado (Weerakoon *et al.*, 2015). A fase intestinal é encontrada em indivíduos crônicos

assintomáticos de áreas endêmicas, com porcentagens em 90 a 95%. Em vários casos os sinais e sintomas são bastante discretos, enquanto a carga parasitária for baixa e a retenção dos ovos nos tecidos for pequeno. Nesse caso as lesões hepáticas são de pequenas proporções, a perda de apetite, desconforto abdominal, astenia, cólicas intestinais, diarreia e a disenteria são bastante variáveis, pois podem ser confundidos com outras doenças helmínticas, dificultando o diagnóstico. Com o aumento da liberação dos ovos na circulação, podem se alojar no fígado e intestino, onde as lesões se agravam e ocorre a forma hepatointestinal. Embora a sintomatologia seja bastante semelhante, as lesões ocasionadas no fígado são mais intensas e prejudiciais do que as lesões ocasionadas no intestino, o baço e o fígado ficam discretamente palpáveis (Domingues *et al.*, 1994; Lambertucci *et al.*, 2000).

A morbidade grave é rara, atualmente acometendo de 5 a 10% da população e podem ocasionar lesões gastrointestinais, com dores abdominais, perda de apetite e diarreia (King, 2001; Ross *et al.*, 2002). Com a embolização dos ovos nos sinusóides hepáticos, há um aumento excessivo de deposição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, levando a uma fibrose periportal e diminuição dos vasos do sistema porta. As consequências são hipertensão periportal, ascite, esplenomegalia, hepatomegalia, varizes esofagianas e sangramento gastrointestinal (Prata, 2001; Ross *et al.*, 2002; Hayashi, 2003; Gryseels *et al.*, 2006).

1.4.1. Resposta imune na infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Os helmintos são importantes parasitos nos estudos de imunomodulação, pois manipulam o sistema imunitário impedindo a sua expulsão do organismo do hospedeiro definitivo. A resposta dominante é Tipo 2 (Wu *et al.*, 2016), que bloqueia as respostas Tipo 1 e Th17 (Hewitson *et al.*, 2009), que envolvem várias células imunológicas, citocinas e quimiocinas.

O antígeno do parasito é reconhecido pelas células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos (APCs), esses antígenos, são levados até as células T, que serão ativadas e começarão a produzir citocinas. Com a produção e liberação de citocinas IL-5, o sistema imunológico inicia a produção de eosinofilia e a liberação de citocinas IL-4, IL-9, IL-13 e IgE. A ativação das células, como os basófilos e mastócitos, causam a indução de citocinas IL-4 e IL-13, aumentando a motilidade e permeabilidade intestinal, que eleva o aumento de muco devido à hiperplasia de células caliciformes. Essas citocinas do perfil Tipo

2 podem atuar na diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (AAM) e balanceia a produção de citocinas do perfil Tipo 1 e Th17.

Na infecção pelo *S. mansoni*, são usados os modelos murinos para investigar detalhadamente a resposta imune perante a infecção. Nas primeiras cinco semanas há predominância da resposta imune Tipo 1, devido a entrada de cercárias, formação dos esquistossômulos e desenvolvimento de vermes jovens e adultos (Pearce *et al.*, 1991; Vella ; Pearce 1992; Wynn *et al.*, 2000; Pearce Macdonald, 2002; Stadecker *et al.*, 2004).

A fase aguda, as reações granulomatosas começam com as células apresentadoras de antígenos (APCs), que capturam e apresentam os antígenos solúveis dos ovos (SEA), aos linfócitos CD4⁺ pela via do complexo de Histocompatibilidade de classe II (MHC II), liberando citocinas inflamatórias. A predominância da resposta Tipo 1, estimula os mecanismos dependentes de fagócitos e de citotoxicidade celular, ativando macrófagos e células dendríticas, entre outras células, que induzem e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias como: INF- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Tais citocinas induzem uma forte resposta celular, tentando isolar e eliminar as fases evolutivas do parasito nos órgãos e tecidos do hospedeiro definitivo. Por outro lado, as citocinas do Th1, induzem uma inflamação intensa que pode ser exacerbada, ajudando a lesionar os tecidos do indivíduo, levando a processos imunopatológicos (Stadecker *et al.*, 2004).

Com o início da oviposição, o sistema imune ativa as células NK (Natural Killer) e células dendríticas, que iniciam a produção de IL-10 e reduz os níveis de IL-12, induzindo a imunomodulação e um desvio para a resposta Tipo 2, que é induzida primariamente, devido aos antígenos dos ovos (Pearce and MacDonald, 2002). A esquistossomose é causada principalmente pela deposição dos ovos nos tecidos do hospedeiro definitivo, desses os ovos viáveis liberam antígenos solúveis, que induzem uma reação inflamatória, a formação do granuloma e fibrose no intestino e no sistema porta hepático (Caldas *et al.*, 2008).

Na fase inicial da formação do granuloma, há participação das moléculas de adesão (ICAM-1), promovendo o contato célula-célula. O aumento da expressão de ICAM-1 é induzido por IL-1 β , Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α) (Dustin *et al.*, 1986; Stadecker *et al.*, 2004). A fase aguda o granuloma é celular com eosinófilos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas. É nessa fase que pode ocorrer à exacerbção da inflamação, com lesões intensas nos órgãos (Lambertucci, 2010). Ainda , além de ser a fase que ocorre uma mudança para o perfil Tipo 2.

Com a evolução da doença, o granuloma diminui o seu diâmetro e sua inflamação, processo denominado de modulação (Caldas *et al.*, 2008)., ocorrendo durante a resposta tipo 2 o aumento de macrófagos alternativamente ativados de células T reguladoras e a ativação de linfócitos Tipo 2. Citocinas típicas dessa resposta estimulam resposta humoral, sendo as principais citocinas: IL-4, IL-5 e IL-13, que contribuem para a formação do granuloma e eosinofilia na fase crônica, inibindo as células Tipo 1 (Oliveira *et al.*, 2006).

Várias células efetoras trabalham em conjunto para manter a homeostase do organismo, na resposta tipo 2. Nos modelos murinos, foram observados que macrófagos são células encontradas praticamente em todos os tecidos do organismo, quando ocorre a ativação dos macrófagos (M ϕ (IL-4) pela IL-4R α , há produção de proteína quinase tipo Ym1, RELM α , arginase entre outros. Os macrófagos com a sinalização de IL-4R α provoca a indução da resposta imune para o perfil Tipo 2 (Rückerl & Allen, 2014). Os macrófagos não agem sozinhos na sua função efetora, os eosinófilos são fundamentais para a função tipo 2 (Lee & Tontono, 2014). Com a mudança do ambiente no organismo, as células de defesas e macrófagos são ativadas e secretam citocinas fibrogênicas como TGF- β e IL-13, e mediadores que auxiliam na diminuição e regulação da resposta inflamatória, como a indução e aumento de células estreladas hepáticas (HSCs) (Gressner *et al.*, 2002). As (HSCs), são células com alta plasticidade com capacidade de diferenciar em miofibroblastos e expressam filamentos intermediários de α - actina do músculo liso (α -SMA), colágenos e componentes da matriz extracelular, que são importantes no remodelamento do tecido fibroso (Friedman, 2008). A regulação desse processo é feita por metaloproteinases e inibidores teciduais (Hemmann *et al.*, 2007).

Citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10, estão presentes na fase mais tardia da infecção, diminuindo a inflamação tecidual e os processos patológicos mais agudos, havendo capacidade para regular a resposta Tipo 1, Tipo 2 e Th17. Mas, falhas no mecanismo das células T regulatórias, podem causar uma reação granulomatosa exacerbada, provocada por células tipo 1, tipo 2 e tipo 17. As células Th17 são subgrupos de TCD4⁺, que são células produtoras de IL-17, citocina inflamatória, relacionada a doenças autoimunes e inflamações crônicas (Anthony *et al.*, 2007). Essas características da modulação da resposta imune favorecem também a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro definitivo e são exemplos da adaptabilidade do parasito ao hospedeiro como é demonstrado na Figura 6 (Dunne & Cooke, 2005).

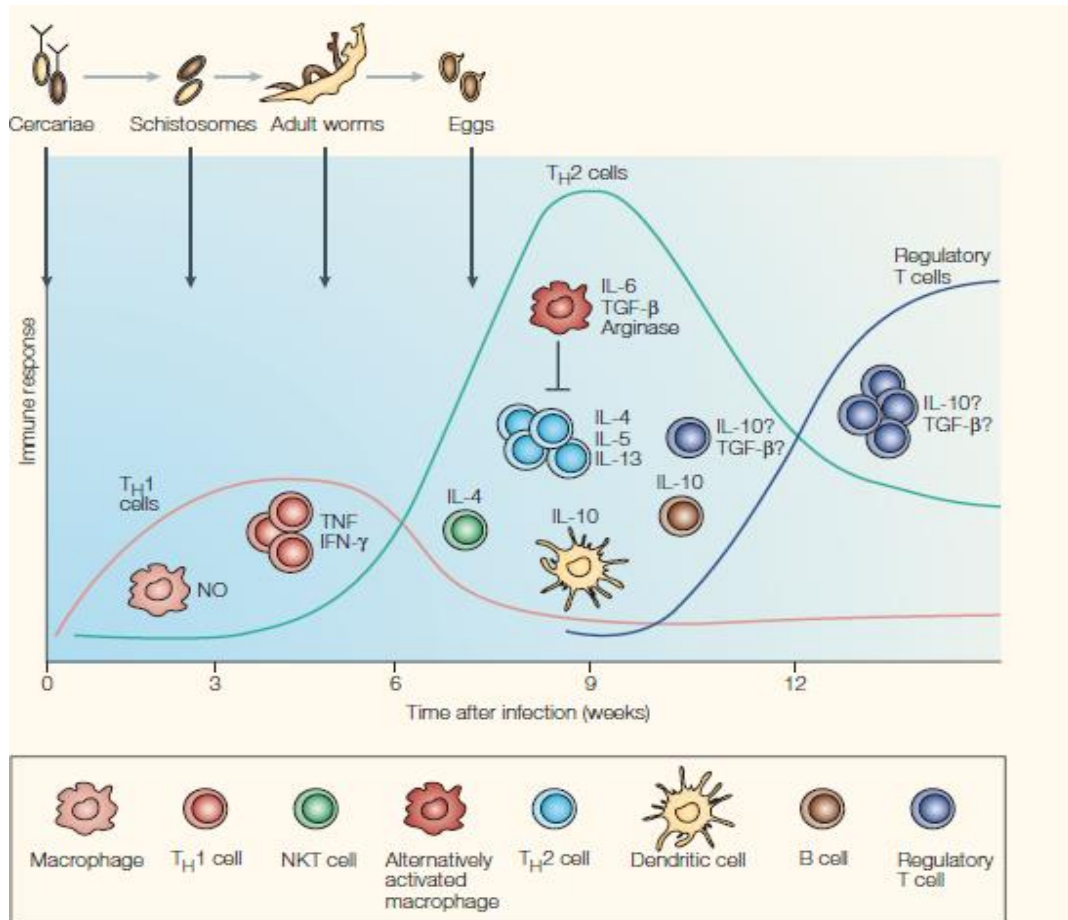


Figura 5 – Interação parasito-hospedeiro no sistema imunológico, perante infecção por *Schistosoma mansoni*

Fonte: Dunne and Cooke (2005)

A resposta imune inicial que se desenvolve é a resposta Th1. A medida que os vermes se desenvolvem e os ovos são liberados, células NKT são ativadas, células dendríticas produzem mais IL-10 e menos IL-12, e uma resposta Th2 se desenvolve. em adição mais IL-10 é produzida em resposta a aos antígenos do ovo e do verme. Além disso, populações de macrófagos alternativamente ativados (m2) e células regulatórias também se desenvolvem. IFN-, interferon- γ ; NO, óxido nítrico; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; tnf, *tumour-necrosis factor*.

Além das citocinas citadas acima, há um conjunto de citocinas quimiotáticas chamadas de quimiocinas, que são importantes mediadores ou reguladores da inflamação, com peso molecular 7–12 kDa (Kufareva *et al.*, 2015).

Há quimiocinas com quatro cisteínas conservadas, que formam duas pontes dissulfetos. Com base nas posições das cisteínas, tem sido atribuído em quatro grupos diferentes. Quimiocinas CCL são quimiocinas nas quais cisteínas estão adjacentes, quimiocinas CXCL contém duas cisteínas separadas por um aminoácido, quimiocinas XCL não há primeira das duas cisteínas e as quimiocinas CX3CL, possuem três aminoácidos entre as cisteínas (Zlotnik & Yoshie, 2012). As quimiocinas e citocinas produzidas na inflamação tem a capacidade de recrutar, reter e modular o granuloma. A polarização pra Tipo 2 inibem

as quimiocinas CXC e induzem a produção de quimiocinas CC, que são quimioatraentes de basófilos, eosinófilos, monócitos e células B e T (Wasmuth *et al.*, 2010).

Nas células hepáticas são produzidas várias quimiocinas, devido às lesões provocadas no órgão, às células de Kupffer, células endoteliais e hepatócitos secretam CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), para o recrutamento de leucócitos no começo da inflamação (Marra & Tacke, 2014).

Nas fases iniciais da formação do granuloma, há um aumento dos receptores (CCR1 e CCR5), com o ligante CCL3 que é observada nas fases iniciais e se mantém nas fases tardias da reação granulomatosa. Na retenção dos ovos no fígado, ocorre o aumento de receptores (CCR2 e CCR3), que se ligam em CCL17 que também pode ser ligada aos receptores de CCL3 (CCR1 e CCR5). No recrutamento de monócitos e macrófagos, há a produção de quimiocinas CCL2 e CCL12 (Martins-Filho *et al.*, 1999; Silveira-Lemos, 2004). Com a modulação da resposta Tipo 2 e final da fase aguda, estimulam a produção de Eotaxinas 1 e 2 (CCL11 e CCL24) são ativadoras e quimioatraentes de eosinófilos e linfócitos (Zimmermann & Rothenberg, 2003).

Geiger *et al.* (2013), em estudo longitudinal com indivíduos co-infectados com vários helmintos e com *S. mansoni*, mostraram marcadores séricos sistêmicos para a resposta Tipo 1/ Tipo 2, observando concentrações elevadas de quimiocinas CCL11 e CCL17, antes do tratamento e após as reinfecções. E concentrações no soro da citocina regulatória IL-10, relacionada à infecção pelo *S. mansoni* e a intensidade da infecção.

As reações imunológicas e granulomatosas possuem várias vias de recrutamento de células e anticorpos, que favorecem a eliminação da infecção pelo *S. mansoni*. As citocinas e as quimiocinas tem um importante papel na resposta imune do hospedeiro, são essenciais para a homeostase do organismo.

1.4.2. Resposta imune de indivíduos que vivem em áreas endêmicas para a esquistossomose

Nas áreas endêmicas, existem indivíduos que possuem uma imunidade parcial adquirida, são aqueles que seu diagnóstico é positivo pelo *S. mansoni*, possuem uma carga parasitária baixa e conseguem viver bem com o parasitismo. Esses indivíduos são caracterizados, como menos susceptíveis a reinfecção, essas características são adquiridas pela constante exposição aos antígenos do parasito, que regula a resposta potencialmente Tipo 2, sendo induzida também por vários tratamentos quimioterápicos em massa com o praziquantel (Black *et al.*, 2010). O seu perfil imunológico, consiste na indução e produção de

células Tipo 2 e células T regulatórias que são evidentes e efetivas, impedindo que ocorra o aumento exacerbado da carga parasitária nesses indivíduos, regulando a patologia. A imunidade parcial adquirida a reinfeção está diretamente relacionada ao aumento da imunoglobulina IgE, a diminuição da imunoglobulina IgG4 e a produção específica de citocinas Tipo 2, IL-4 e IL-5 (Oliveira *et al.*, 2012).

Os chamados “normais endêmicos” são aqueles que já tiveram contato com águas com *Biomphalaria* infectadas com *S. mansoni*, é uma população com subgrupos de indivíduos que são totalmente negativos ou possuem infecções pré-patentes ou pós-patente, infecções ocultas ou serem pacientes com uma carga parasitária extremamente baixa. Esses indivíduos, possuem uma resposta imune eficiente Tipo 2 e células T regulatórias no seu perfil imunológico, aumento da imunoglobulina IgE contra o tegumento dos esquistossômulos, aumento da imunoglobulina IgG contra a paramiosina do parasito. Quando esses indivíduos são estimulados com antígenos do *Schistosoma*, as células mononucleares do sangue periférico (pbmc) proliferam rapidamente e produzem níveis elevados de IFN- γ , diferenciando de indivíduos primo- infectados, que são indivíduos que tiveram o primeiro contato com a infecção. Os “normais endêmicos” possuem imunidade parcial adquirida a reinfeção. Essas características mostram que a proteção contra a esquistossomose, está relacionada à modulação e o equilíbrio das células T CD4⁺ e as respostas Tipo 1 e Tipo 2 (Caldas *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2012; Matoso *et al.*, 2013). Indivíduos de áreas endêmicas possuem um perfil imunológico específico e adaptado, necessitando de mais estudos sobre essa população, sendo um problema para o diagnóstico e a total eliminação da esquistossomose nessas áreas.

2. JUSTIFICATIVA

A distribuição da esquistossomose é irregular em Minas Gerais, com áreas de prevalências altas, baixas e nulas. As maiores prevalências são encontradas na região Norte e Leste do Estado Vales do Mucuri, Rio Doce e Zona da Mata, com prevalência de 25 a 75%, demonstrando uma ativa transmissão da esquistossomose nessas áreas. O Estado de Minas Gerais possui 853 municípios e a esquistossomose é encontrada em 519 municípios (Katz & Carvalho, 1983; Drummond *et al.*, 2006).

Em algumas áreas endêmicas houve a diminuição da morbidade da doença, mas ainda são áreas que o ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* mantém-se ativo.

A esquistossomose é controlada pelo PCE, com a estratégia do programa houve uma redução significativa da carga parasitária no nível populacional ao longo dos anos, devido aos quimioterápicos preventivos, sendo administrados em grande escala nas populações de risco (Cavalcanti *et al.*, 2013). Esse procedimento pode acarretar nos indivíduos uma melhora significativa, diminuindo a intensidade da infecção, mortalidade e morbidade (Spear *et al.*, 2011). O método padrão de diagnóstico, é o exame de Kato-Katz, com duas lâminas examinadas, permite que 40-50% dos indivíduos infectados sejam diagnosticados como falsos- negativos (Oliveira, 2015). Para melhorar a sensibilidade do diagnóstico pelo método de Kato-Katz é necessário aumentar a quantidade de lâminas a ser analisadas ou a aplicação de métodos alternativos e/ou complementares (Enk *et al.*, 2008).

No presente trabalho, houve a realização de extensos exames parasitológicos de fezes, o método padrão Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) em combinação com outros métodos mais sensíveis, como os métodos de Helmintex[®] (Caldeira *et al.*, 2012) e Gradiente Salino (Coelho *et al.*, 2009), para um diagnóstico mais sensível e confiável. Com o aumento da sensibilidade dos testes parasitológicos foi possível detectar e classificar indivíduos infectados com *S. mansoni*, cuja carga parasitária é extremamente baixa, que pelo método de Kato-Katz, estariam classificados como indivíduos negativos, esses indivíduos são extremamente importantes, pois contribuem para a manutenção do ciclo biológico em áreas endêmicas.

Esses fatos justificam a busca de métodos mais sensíveis, como, por exemplo, marcadores imunológicos no sangue periférico de indivíduos com carga parasitária extremamente baixa, que poderiam indicar a presença do parasito. Portanto, o objetivo desse trabalho era caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas desses indivíduos, para buscar diferenças específicas dos demais grupos. Identificar essa população distinta significa

melhorar o diagnóstico da esquistossomose nas áreas endêmicas e diminuir a quantidade de indivíduos falsos-negativos, melhorando o controle da esquistossomose em áreas endêmicas. Com isso, tais fatos se tornam os principais focos do presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas, no sangue periférico de indivíduos infectados com *S. mansoni*, que são classificados pelos testes parasitológicos como indivíduos de carga parasitária extremamente baixa, a fim de buscar marcadores imunológicos da infecção, que possam indicar a presença do parasito.

3.2. Específicos

- Classificação da população de estudo em: indivíduos infectados com *S. mansoni* e carga parasitária definida pelo método de Kato-Katz; indivíduos infectados com carga parasitária extremamente baixa, negativos no método de Kato-Katz, mas positivos nos métodos de Gradiente Salino e/ ou Helmintex[®], e indivíduos ovo-negativos durante repetidos exames parasitológicos de fezes.

- Avaliação de marcadores tipo 1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-27 e CXCL10), marcadores Tipo 2 (IL-5, IL-13, CCL11, CCL17), marcador Th17 (IL-17) e marcador regulatório (IL-10), secretadas no sangue periférico, durante a infecção por *S. mansoni* em indivíduos classificados como carga parasitária extremamente baixa e comparação com indivíduos com carga parasitária definido pelo método de Kato-Katz e indivíduos ovo-negativos durante diversos testes parasitológicos.

- Correlação da intensidade da infecção (população positiva na infecção pelo *S. mansoni* apenas no método de Kato-Katz), com marcadores imunológicos e os dados hematológicos nos indivíduos dos diferentes grupos.

- Avaliação de marcadores Tipo 1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-27 e CXCL10), marcadores Tipo 2 (IL-5, IL-13, CCL11, CCL17), marcador Th17 (IL-17) e marcador regulatório (IL-10), secretadas no sangue periférico dos indivíduos infectados e tratados com praziquantel, três meses após o tratamento e compara-los com os mesmo indivíduos, Tempo zero (pré-tratamento).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População e área de estudo

A região do Município de Januária (Figura 6) está situada no Norte de Minas Gerais, com clima semiárido, localizada no Médio São Francisco, com 68.247 habitantes, estimados pelo IBGE (2015). O Município de Januária possui vários distritos, entre eles, o de interesse para o nosso trabalho, chamado Brejo do Amparo. A localidade rural no Brejo do Amparo fica a 3 km de Januária, com aproximadamente 270 habitantes fixos, que tem como meio de subsistência o cultivo de cana-de-açúcar, milho e feijão. Toda a extensão do distrito de Brejo do Amparo se encontra banhado pelo córrego Tocantins (Figura 7) que é criadouro de *Biomphalaria glabrata*. O distrito não possui saneamento básico, sendo usado o córrego para a recreação, lavagem de roupas, lavagem de vasilhas, consumo próprio de humanos e de animais, sendo um importante veículo ativo para a disseminação da esquistossomose na região.

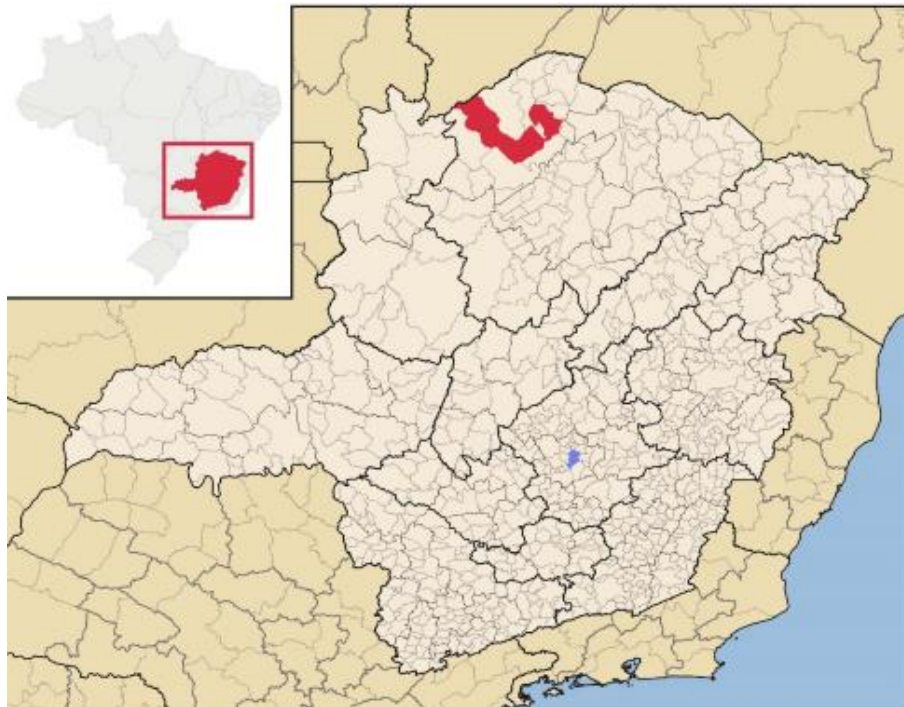


Figura 6 – Localização do município de Januária, Minas Gerais.

Fonte: IBGE (2015)

Por meio de intervenções do governo, o PCE da região preconiza, o diagnóstico feito por exames parasitológicos de fezes, com uma amostra fecal e uma lâmina de Kato-Katz para identificar indivíduos infectados. Em casos de positividade para esquistossomose mansônica,

o indivíduo recebe o tratamento adequado, com a droga praziquantel. Por meio desse processo, o Município de Januária, conseguiu diminuir a frequência de casos graves da esquistossomose, entretanto, ainda existem distritos e áreas com prevalências elevadas, indicando que o ciclo biológico e a transmissão do parasito *S. mansoni*, ainda se mantém ativo (Setor de Endemias, Prefeitura de Januária, comunicação pessoal).

Na população estudada, não houve tratamento contra a esquistossomose nos últimos 2 anos. A prevalência da esquistossomose subiu de 20,4% após a aplicação do K-K preconizada pela OMS (duas lâminas) e para 45,9% após a aplicação de diversos e extensos exames parasitológicos de fezes (Oliveira, 2015). Esses dados demonstraram, que mais de 50% dos indivíduos realmente infectados com *S. mansoni* foram diagnosticados como falso-negativos pelo método padrão. A baixa sensibilidade do método de K-K, aplicado em áreas de baixa endemicidade, pode então facilitar a manutenção e a disseminação da esquistossomose na região.



Figura 7 – A e B o córrego Tocantins, Brejo do Amparo, principal veículo de transmissão da esquistossomose na região.

Fonte: Fotografia da autora.

4.2 Considerações éticas

Antes do início do trabalho de campo, a comunidade do Brejo do Amparo foi informada sobre o estudo, acarretando a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pelos participantes. O termo visou explicar toda a coleta de material biológico que seria feita no local. Crianças e adolescentes assinaram um Termo de

Assentimento, além do Termo de Consentimento assinado pelos pais e guardiões (Anexo 1). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE#21824513.9.0000.5091 – Anexo 2).

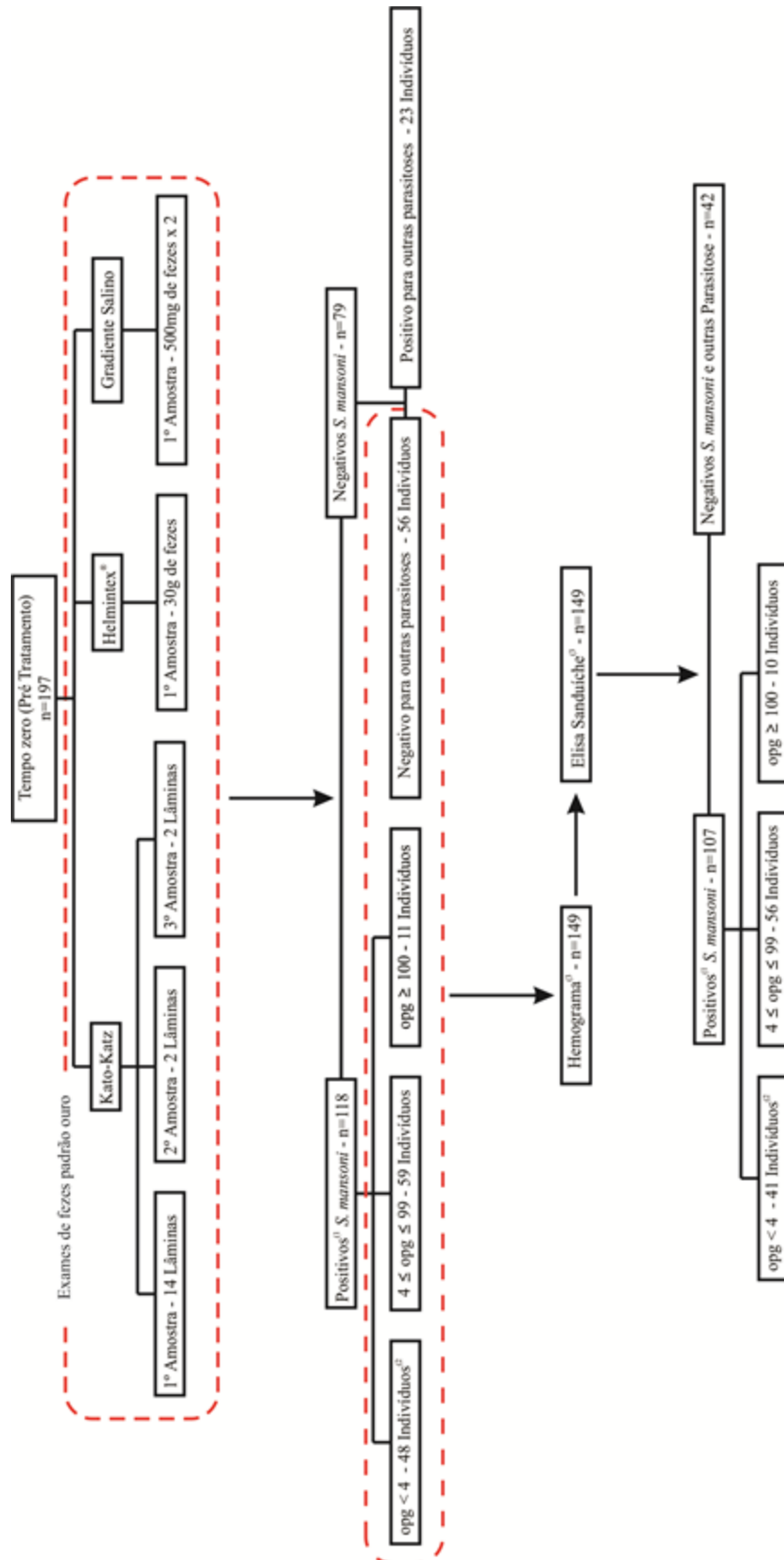
4.3 Obtenção de material biológico e métodos de diagnóstico para esquistossomose

O presente trabalho é longitudinal, tendo como finalidade a comparação dos grupos de indivíduos com características observadas em um período temporal. Com isso, para analisar a evolução de um determinado episódio, no caso em estudo, se utilizou marcadores imunológicos na infecção pelo *S.mansoni*.

No primeiro momento, denominado Tempo zero (pré-tratamento), no Distrito de Brejo de Amparo foram feitos exames parasitológicos de fezes (epf) de 197 moradores das seguintes localidades: Santana, Tocantins e Pé da Serra. Posteriormente, houve separação da população em Positivos e Negativos na infecção pelo *S. mansoni*. No grupo dos ovo-negativos, 23 indivíduos não apresentaram características adequadas para o estudo, visto que, possuíam infecções com outras parasitoses. Dos 174 indivíduos restantes, se realizou os exames de sangue de 149 indivíduos (Figura 8). Amostras de sangue, foram obtidas de todos os indivíduos participantes, para a condução de um hemograma completo (5 mL em tubo com EDTA), realizado por um laboratório terceirizado situado no Município de Januária, além dessas amostras, foram coletas outras amostras de sangue (5-10 mL em tubos siliconizados) para obtenção de soro. No laboratório de campo, os tubos siliconizados foram centrifugados durante 15 minutos a 2.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o soro de cada participante foi extraído e alíquotados 500 µl em tubos eppendorf. Os tubos eppendorf foram estocados em freezer a -20°C, sendo os tubos codificados de acordo com cada indivíduo. Com o término das atividades de campo, os soros estocados, foram transferidos para o Departamento de Parasitologia da UFMG, onde as amostras ficaram guardadas no freezer a -80°C até o seu uso em ensaios imunológicos.

Nos indivíduos infectados com *S. mansoni*, o exame parasitológico de fezes e a retirada de sangue para obtenção de soro foi repetida no Tempo 3 meses pós-tratamento com praziquantel. Dos 84 pacientes, além dos exames parasitológico de fezes, foram feitas dosagens de marcadores imunológicos, por meio do método de Elisa (Figura 9). No decorrer do trabalho, algumas desistências, por diferentes motivos ocorreram.

Figura 8 – Detalhamento do Tempo zero (pré- tratamento)

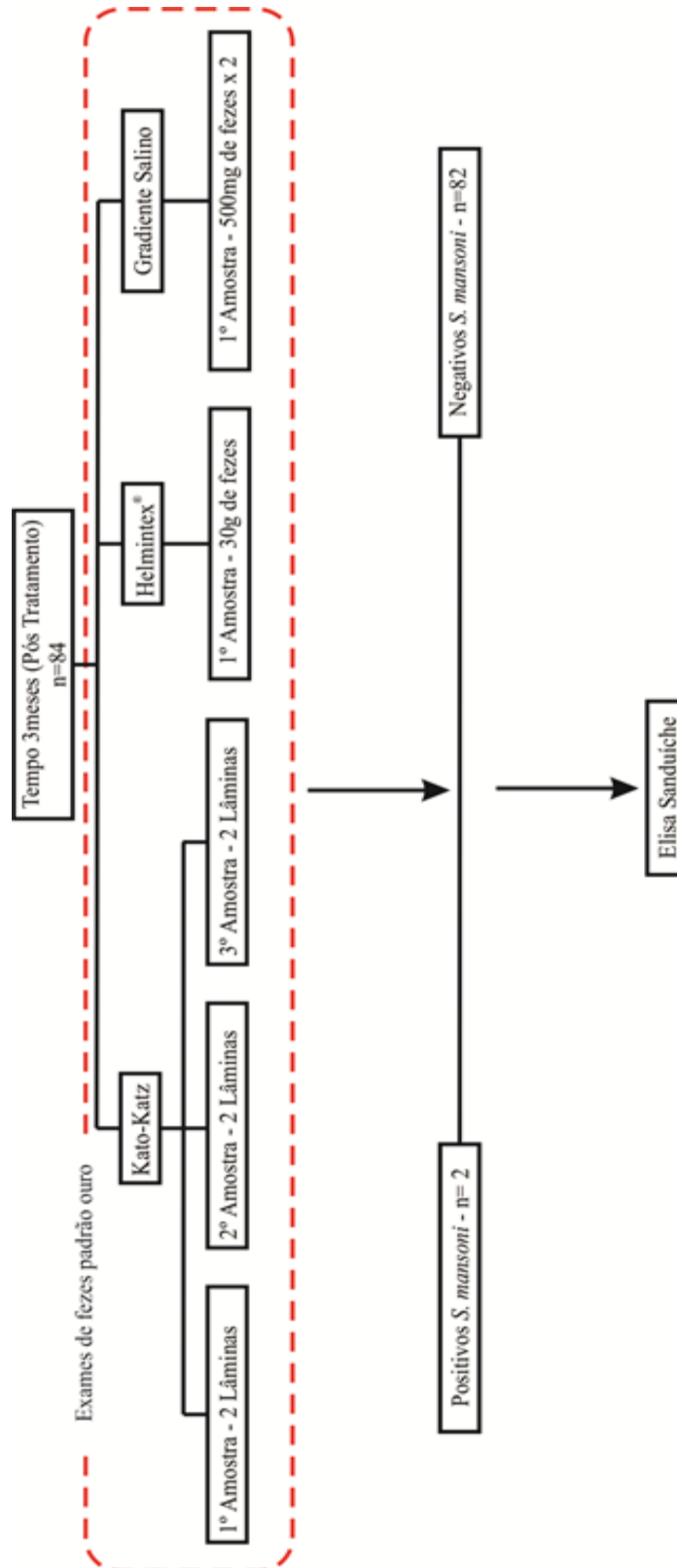


1) Todos os indivíduos Positivos para *S. mansoni* apresentavam outros parasitoses

2) Todos os indivíduos Negativos para *S. mansoni* no exame Kato-Katz mas positivo em outros exames parasitológicos.

3) Dos 174 indivíduos que iniciaram o processo de diagnóstico e foram diagnosticados como positivos para *S. mansoni* ou negativos para qualquer parasitose, 25 deles não participaram do processo de diagnóstico por meio de exame de sangue e imunológico.

Figura 9 – Detalhamento do Tempo 3 meses (pós- tratamento)



4.4 Métodos parasitológicos de fezes

4.4.1 Kato-Katz: Kato (1954) modificado por Katz et al. (1972)

O Kit Helm Test – Biomanguinhos, Rio de Janeiro – RJ (Figura 10) foi utilizado para confecção das lâminas e posteriormente análise no microscópio óptico. O Kato-Katz é um método qualitativo e quantitativo, aprimorado por Katz e colaboradores (1972).

Quantidades de lamínulas necessárias para a utilização do teste, foram colocadas, numa placa de petri e adicionada a elas a solução diafanizadora (verde de malaquita). As fezes foram homogeneizadas com o auxílio de uma espátula e colocadas sobre o papel higiênico. Sobre as fezes se depositou uma tela, que foi comprimida, com o auxílio da espátula, sobre as fezes, permitindo assim, a retirada apenas das fezes que conseguiam atravessar a tela. As fezes que atravessaram a tela foram recolhidas pela espátula e colocadas na placa que contém o orifício, que já está sobre a lâmina de vidro. Após as fezes estarem depositadas na lâmina de vidro, a placa com orifício é retirada e uma lamínula é colocada sobre o cilindro de fezes, sendo a lâmina de vidro invertida sobre superfície lisa e a região contendo a lamínula recebe uma pequena pressão do polegar. Com a finalização do processo, a preparação é posta em repouso por 60 minutos, podendo ser levada ao microscópio para a observação e contagem dos ovos de helmintos em seguida.



Figura 10 – kit Helm Test, método de Kato-Katz
Fonte: Fotografia da autora.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do método de Kato-Katz, o número de amostras fecais coletadas e de lâminas confeccionadas foi aumentado (De Vlas; Gryseels, 1992). Com isso, o método foi executado com três amostras fecais e com quatorze lâminas da primeira amostra, duas da segunda e duas lâminas da terceira amostra no Tempo zero do estudo. Cada lâmina de K-K corresponde a 42 mg de fezes examinadas. Três meses após tratamento, os indivíduos curados foram examinados novamente com três amostras fecais e duas lâminas de K-K em cada amostra para verificar uma possível reinfecção por *S. mansoni*.

Para a análise quantitativa, a contagem dos ovos em cada lâmina de fezes é multiplicada por 24. O cálculo utilizado mostra que, em cada lâmina parasitológica de fezes, são necessários 42 mg de fezes, e ao se multiplicar por 24, calcula-se um valor aproximado de 1 grama de fezes ($42 \text{ mg} \times 24 = 1,008 \text{ g}$). Então a média dos ovos ou o número dos mesmos, multiplicado por 24 consiste, no número de ovos por grama de fezes (opg).

4.4.2 *Helmintex*[®] (Teixeira et al., 2007)

O método de *Helmintex*[®] realizado, utiliza apenas a primeira amostra de fezes, sendo um método mais sensível para as regiões de baixa endemicidade.

As fezes coletadas são homogeneizadas com adição de formol 10%. A primeira tamisação é feita com uma peneira de abertura de 500 μm , sendo utilizada espátula e água destilada no processo. A amostra foi sedimentada por uma hora. Em seguida, a água destilada foi trocada, e esse processo repetido até a água no cálice de sedimentação tornar-se límpida. O sedimento da água límpida, sofreu processos de tamisação usando-se peneiras de diferentes aberturas 100 (S1), 200 (S2) e 325 (S3). Com a ressuspensão do material retido na malha S3 com a água destilada, ocorreu mais uma sedimentação por uma hora. Depois, o sedimento foi colocado no tubo falcon de 15 ml, com água e acetato de Etila, sendo chamado tal processo de método de Ritchie (Ritchie, 1948), que tem a finalidade de separar um anel de sujeira e o sedimento. Ao fim do processo esse sedimento é retirado do falcon e colocado no eppendorf, adiciona-se 19 μL contendo esferas paramagnéticas. Os eppendorfs foram agitadas por uma hora, no agitador orbital (Phoenix), sendo em seguida colocadas em contato com o magneto (BioMag[®]) durante 3 minutos utilizando-se ao final o sedimento que ficou preso nas paredes do eppendorf. Esse material, com algumas gotas de salina, foi colocado em uma lâmina de vidro para observação dos ovos de *Schistosoma mansoni* no microscópio óptico.

A sensibilidade do método de Helmintex[®], quando a carga parasitária é de 1,3 ovo por grama de fezes é de 100%, decaindo a 25 % quando a carga parasitária diminui para 0,1 ovo por grama de fezes (Teixeira *et al.*, 2007).

4.4.3 Gradiente Salino (Coelho *et al.*, 2009)

O método de Gradiente Salino utiliza equipamento próprio para essa finalidade (Figura 11). Esse equipamento consiste em dois tubos cilíndricos transparentes, que possuem capacidade volumétrica diferente e alturas diferentes. O recipiente maior comporta 50mL de líquido e está em cima do recipiente menor que comporta 10mL de líquido. Por uma mangueira de borracha, os dois cilindros são interligados, o fluxo volumétrico possui um regulador de fluxo, que mantém um padrão de gotejamento (1mL = 20 gotas/minuto). Na parte inferior do recipiente menor, há um filtro com 1 cm de espessura, selado com silício. Na parte do recipiente superior, há uma mangueira que drena o excesso de líquido que é eliminado pelo coletor.

Com 500 mg de fezes, que passam por uma purificação, por meio de um fluxo contínuo e lento de solução de 3% de salina, em intervalo de 60 minutos ocorre a purificação simultânea de até 12 amostras, equivalendo cada amostra a 12 lâminas de Kato-Katz, sendo assim, o método é capaz de processar 144 lâminas por hora, tendo uma maior sensibilidade, comparado com o método de Kato-Katz.



Figura 11 – Equipamento usado no método de Gradiente Salino
Fonte: Fotografia da autora.

O conjunto desses testes de diagnóstico permitiu a caracterização parasitológica extensa e mais confiável, como demonstraram os resultados da Dissertação de Mestrado do aluno Oliveira (2015). Com os resultados dos exames parasitológicos de fezes, foi possível caracterizar diferentes grupos de indivíduos na área endêmica:

(a) Positivos e classificados pelo método de K-K em carga baixa, média e alta (WHO, 2002), (b) indivíduos com carga parasitária extremamente baixa, diagnosticados apenas pelos métodos de Gradiente Salino e/ou Helminex[®], (c) indivíduos negativos em todos os testes parasitológicos aplicados e (d) indivíduos infectados e tratados e reexaminados 3 meses após tratamento com praziquantel.

4.5 Dosagem de citocinas e quimiocinas no sangue periférico

A coleta de sangue venoso, foi feita em crianças maiores de 6 anos e adultos até 70 anos, no braço e antebraço, sendo coletado 10 mL de sangue para o soro e ensaios imunológicos.

Em cada paciente foi avaliado, o estado imunológico através da secreção e dosagem de diversas citocinas e quimiocinas (pg/ml), no sangue periférico, sendo elas: IL-1 β , IL-5 , IL-6, IL-10, IL- 13, IL-17, IL-27, TNF- α , CXCL10, CCL11, CCL17 , usando o protocolo e Kits comerciais de ELISA sanduíche (R&D, Systems USA).

No primeiro momento as microplacas Costar (Corning 3690), foram sensibilizadas, colocando-se anticorpo de captura específico para cada citocina e quimiocina, que tem como função a mobilização direta ou indireta no interior dos poços. diluindo-o em 2,7 ml de PBS (pH 7,4), depois foram seladas as placas e incubadas durante noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as microplacas tiveram 2 sucessivas lavagens, com PBS Tween-20 (0,05%), para a retirada dos anticorpos de captura, que não realizaram ligação na placa. Posteriormente, as microplacas foram bloqueadas com o diluente PBS/ BSA 1%, que tem em sua composição uma proteína ou outra molécula que impede a ocorrência de ligações inespecíficas, sendo a microplaca incubada por uma hora em temperatura ambiente. Depois da incubação, 3 lavagens ocorreram e foram adicionados o padrão e as amostras diluídas dos indivíduos (1:2) em solução diluente (PBS/BSA), ocorrendo nova incubação no período de 2 horas em temperatura ambiente. As microplacas foram lavadas por mais 3 vezes, sendo adicionado o anticorpo de detecção, que são anticorpos específicos para determinados antígenos, após esse procedimento as microplacas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. A microplaca foi lavada mais 3 vezes e utilizada a estreptavidina com a enzima (estreptavidina hrp; 1:40 ou 1:200, seguindo os dados do protocolo em diluente e incubamos 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro). A estreptavidina é uma molécula que possui uma ligação fortemente específica com a molécula de biotina, ocorrendo a amplificação do sinal utilizando o complexo avidina-biotina para amplificação, marcação e detecção do sinal no Elisa, como mostra a (Figura 12). A microplaca foi lavada mais 3 vezes e adicionado o substrato (solução H_2O_2 + tetrametilbenzidina em concentração 1:1). Com isso, a medição do sinal é gerada pela marcação do anticorpo específico ao antígeno, provocando uma mudança na coloração, causada pela estreptavidina acompanhada do substrato. Após 20 minutos, adicionou-se na microplaca o stop solution (2-4N H_2SO_4), que realiza a parada das reações.

O Elisa foi feito em duplicatas das amostras e padrões, com as médias entre as absorvâncias, sendo feita a leitura no aparelho (Versa Max-microplate reader), no programa Softmax Pro 6.4, com comprimento de onda de 450nm. No procedimento para as correções das diluições, foram multiplicadas a média dos resultados por 2, para um valor adequado de absorvância.

Em cada citocina e quimiocina desejadas, foram feitos cálculos específicos para a obtenção da solução do produto do anticorpo de captura, anticorpo de detecção e o padrão.

Para conseguir demonstrar as concentrações de citocinas e quimiocinas em escala logarítmica, amostras com valores abaixo do último ponto da curva padrão foram definidos como 1pg/mL.

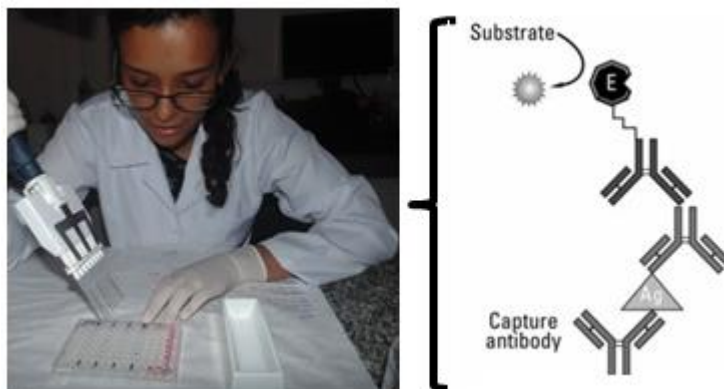


Figura 12 – Método ELISA sanduíche
Fonte: General Capture/Sandwich ELISA Protocol

4.6 Análise estatística

A entrada dos dados e análise foram feitos no Programa GraphPad Prism 5.0. Para analisar a aderência da normalidade das amostras, foi usado o teste de normalidade chamado de D'agostino-Pearson, recomendado pelo GraphPad Prism5, esse teste calcula a assimetria dos dados quantificando, o quanto as amostras analisadas estão longe de adequar a distribuição Gaussiana. Calcula-se cada um dos valores diferentes do valor esperado por uma distribuição Gaussiana e calcula-se o valor de P a partir da soma dessas diferenças observadas. O teste de normalidade relatou que os dados do presente trabalho são dados não paramétricos.

Foi feita análise estatística descritiva (média, mediana, interquartil e desvio-padrão) (Magalhães & Lima, 2010).

Dados não-paramétricos em análise univariada.

- Foram usados os testes de Kruskal-Wallis e Pós-teste de Dunn's que compara as médias de três ou mais grupos independentes.
- Wilcoxon pareado, para medianas de dois grupos pareados. Mann-Whitney para grupos independentes. Antes e depois do tratamento.
- Para a análise de correlação e associação foi usado o teste de Spearman, que mede o grau de associação entre duas variáveis aleatórias e Regressão Linear, que é uma análise estatística que consiste na existência de uma relação funcional entre uma variável dependente, com uma ou mais variáveis independentes, com significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Classificação da população com exames parasitológicos de fezes no tempo zero

No distrito de Brejo do Amparo, 197 indivíduos foram incluídos no presente estudo sendo realizados todos os exames parasitológicos de fezes com o Padrão Ouro: método de Kato-Katz e com os métodos de Gradiente salino e Helmintex®, para subsequente classificação da população em indivíduos positivos e negativos por *S. mansoni*.

A partir do N=197 indivíduos, foram obtidos N=118 indivíduos positivos para *S. mansoni*, desse N, foi encontrado N=48 indivíduos que obtiveram resultado negativo pelo método de Kato-Katz, mas apresentaram resultado positivo nos métodos de Gradiente Salino e/ou Helmintex®, sendo o N restante de 70 indivíduos com resultado positivo pelo método de Kato-Katz, ocorrendo análise quantitativa, contagem da carga parasitária (opg). Os indivíduos negativos são equivalentes a N=79, sendo desconsiderados indivíduos infectados com outros helmintos e protozoários, para se ter um grupo de controle parasitologicamente negativo. Com isso, o grupo de indivíduos negativos apresentou-se com equivalência a um N=57 (Tabela 2).

A caracterização dos grupos foi feito com base nas normas da intensidade da infecção, preconizada pela OMS (WHO, 2002), e considerando estudos recentes de Da Frota *et al.* (2011) e Oliveira (2015). Nesses estudos recentes foi demonstrado, que um aumento do número de lâminas de Kato-Katz superior a seis lâminas de três amostras fecais, não eleva a sensibilidade da técnica (Da Frota *et al.*, 2011; Oliveira 2015).

Com tal ressalva, nós fizemos o cálculo da carga parasitária (opg) dos indivíduos baseado em três amostras fecais e seis lâminas de Kato-Katz. Assim, a sensibilidade e o valor mínimo de opg que pode resultar de seis lâminas foi estabelecido em 4 ovos por grama de fezes (1 ovo encontrado/ $6 \times 24 = 4$ opg). Classificamos os indivíduos positivos por exames de Kato-Katz em dois grupos, conforme a classificação da OMS (WHO, 2002): opg de 4 a 99, com intensidade da infecção leve e $\text{opg} \geq 100$, com a intensidade da infecção considerada moderada a alta (≥ 100 opg). Os indivíduos do grupo negativo no método de Kato-Katz, mas positivo nos métodos de Gradiente salino e/ou Helmintex®, nomeamos como Grupo < 4 opg; os indivíduos do Grupo ovo-negativos foram negativos nos extensos exames parasitológicos de fezes (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos quatro grupos de indivíduos estudados, conforme resultado parasitológico de fezes em relação à infecção com *S. mansoni*: < 4 opg, 4 a 99 opg, ≥ 100 opg e negativos, com o total de 174 indivíduos incluídos (sexo, idade ± desvio padrão, opg com mediana e interquartís , mono-infecções com *S. mansoni* e coinfeções com *S. mansoni* e com outras parasitoses).

Caracterização	Grupos			
	< 4 opg n= 48	4 a 99 opg n=59	≥ 100 opg n=11	Negativos n=56
sexo				
Masculino e Feminino	22 (45,8%), 26 (54,16%)	27 (45,76%), 32 (54,2%)	7 (63,6%), 4 (36,3%)	32 (57,14%), 24 (42,8%)
Idade	35,18 ± 22,17	37 ± 19,15	27,27 ± 21,39	33,14 ± 24,97
OPG (ovos por grama de fezes)				
Mediana* IQ (25%, 75%)**	-	8* (4, 24)**	280* (144, 792)**	-
Mono-infecções com <i>S. mansoni</i>	26 (54,16%)	24 (40,67%)	6 (54,54%)	-
Coinfeções com <i>S. mansoni</i> e outros Helmintos	2 (4,1%)	2 (3,38%)	1 (9%)	-
Coinfeções com <i>S. mansoni</i> e outros protozoários	20 (41,66%)	31 (52,54%)	2 (18,18%)	-
Coinfeções com <i>S. mansoni</i> e outros Helmintos e protozoários	-	2 (3,38%)	2 (18,18%)	-

Fonte: Resultados da pesquisa.

Para verificar se houve diferença na carga parasitária em distintas faixas etárias da população, foram analisados indivíduos com resultado positivo pelo método de Kato-Katz (Figura 13A). Não houve diferença significativa na intensidade da infecção (opg) nas distintas faixas etárias comparadas. As medianas nas faixas etárias iniciais de 0-10 e 11-20 anos de idade foram de 50 e 12, respectivamente. Aumentando a mediana na faixa etária de 31-40 anos de idade, ocorrendo a diminuição da mediana para 8, em indivíduos mais velhos.

Observamos que a intensidade da infecção, apresenta uma maior tendência nas faixas etárias jovens, decaindo com o passar dos anos. Porém, não houve diferença significativa (Figura 13A).

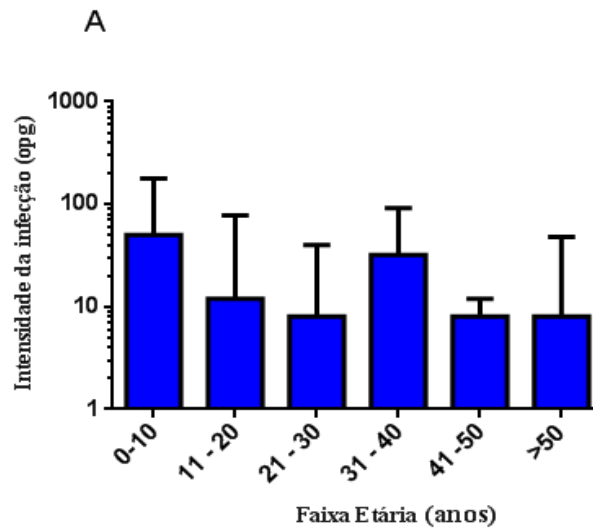


Figura 13 – Distribuição da intensidade da infecção pelo *S. mansoni* por faixa etária em uma comunidade rural do distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária, Norte de Minas Gerais. Em total, 70 indivíduos positivos pelo método de Kato-Katz foram classificados pelas faixas etárias. A carga parasitária individual (opg) resultou da contagem de ovos em seis lâminas de Kato-Katz e a carga parasitária por faixa etária foi indicada por mediana, junto com os interquartis (25 e 75%).

Fonte: Resultados da pesquisa.

A Figura 14 mostra a prevalência dos indivíduos positivos para *S. mansoni*, separada por faixas etárias e carga parasitária. Para indivíduos diagnosticados, com o método de Kato-Katz (4 a 99 opg e ≥ 100 opg, n= 70), houve um pico maior entre a faixa etária de 11 a 20 anos, decaindo com o aumento da idade na população. Já na análise das prevalências por faixa etária dos indivíduos com carga parasitária extremamente baixa (< 4 opg, n= 48), observou-se o contrário, a prevalência na primeira faixa etária se apresentou alta, decaindo nas faixas etárias de crianças, adolescentes e jovens adultos, aumentando novamente em adultos e idosos (Figura 14).

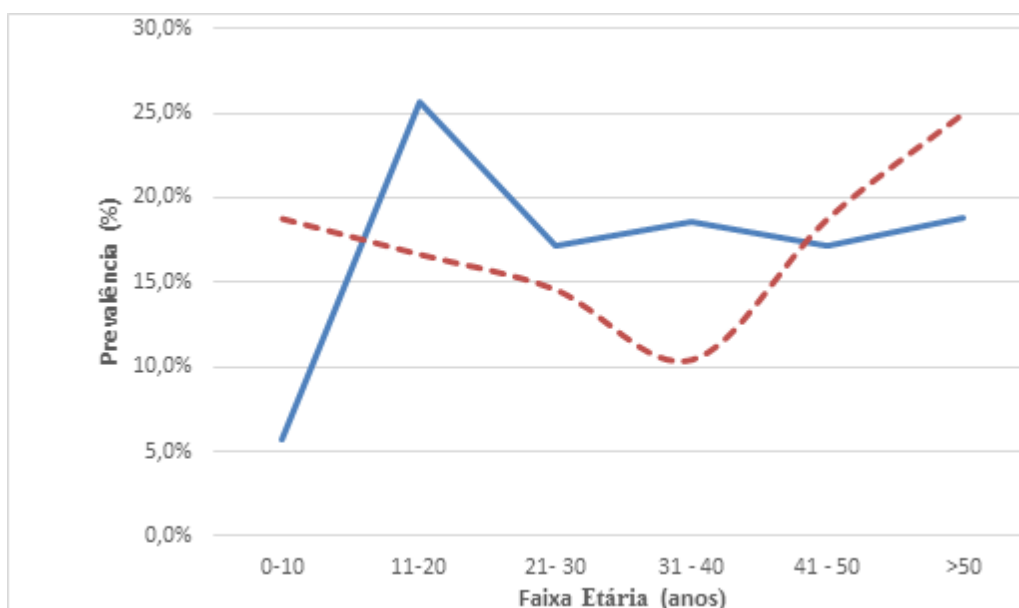


Figura 14 – Prevalência por faixa etária em indivíduos infectados com *S. mansoni* e classificados como ≥ 4 opg (linha azul, contínua) e < 4 opg (linha vermelha, tracejada).

Fonte: Resultados da pesquisa.

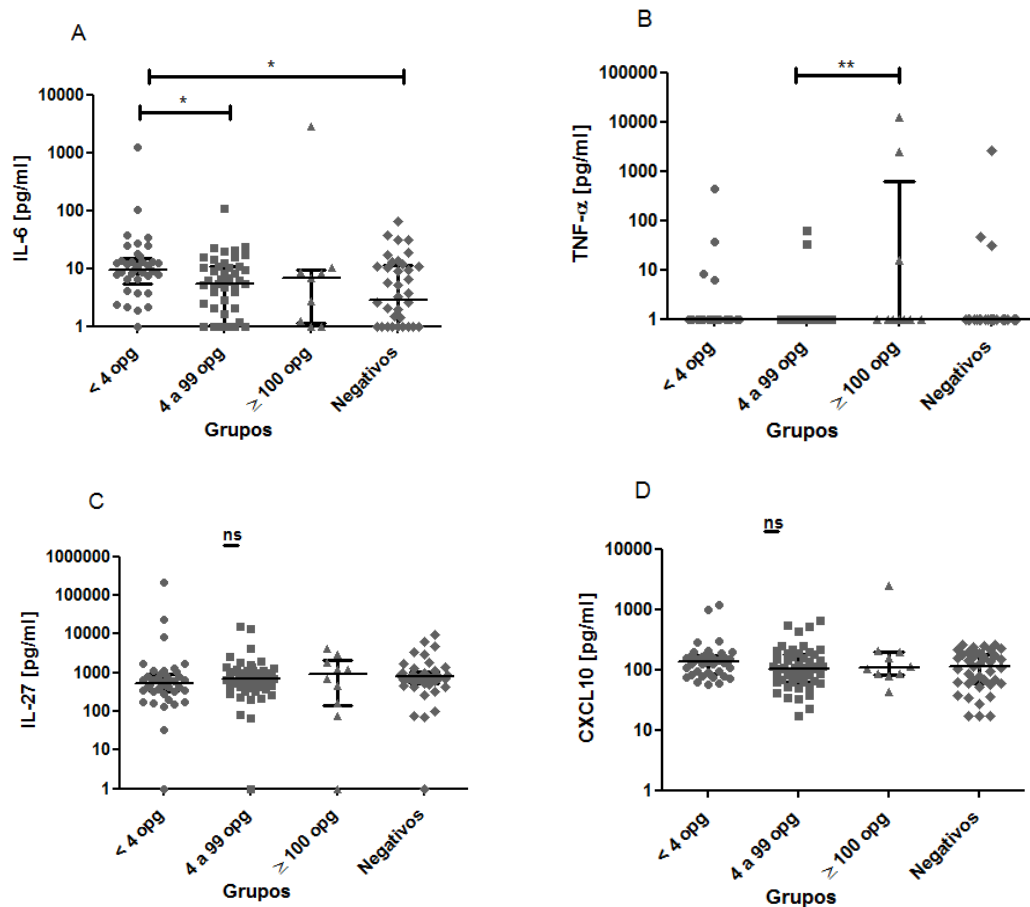
5.2 Perfil de citocinas e quimiocinas no sangue periférico em indivíduos infectados com *S. mansoni* – Tempo zero

No início do estudo (Tempo zero, pré-tratamento), foram dosadas citocinas e quimiocinas no sangue periférico para a descrição do perfil imunológico em busca de marcadores distintos em indivíduos com carga parasitária extremamente baixa < 4 opg, em comparação com os demais grupos de indivíduos infectados e indivíduos ovo-negativos.

Foram dosadas citocinas e quimiocinas Tipo 1, Tipo 2, Th17 e T reguladora no sangue periférico (soro) de indivíduos participantes.

As concentrações séricas das citocinas IL-1 β e IL-17 foram mínimas nos quatro grupos analisados e perto do limite de detecção (dados não mostrados). A concentração da citocina tipo 1 IL-6 foi significativamente maior no grupo < 4 opg quando comparado com o grupo 4 a 99 opg e com grupo Negativo (ambos $p=0,01$) (Figura 15A). Para a citocina tipo 1 TNF- α , não foi possível detectar concentrações elevadas na maioria dos indivíduos dos quatro grupos. Porém, no grupo de ≥ 100 opg, no soro de dois indivíduos com carga parasitária alta foi possível de detectar concentrações consideráveis de TNF- α e a produção foi

significativamente maior, quando comparado com o grupo 4 a 99 opg ($p \leq 0,05$) (Figura 15B). Mesmo com concentrações séricas detectáveis, IL-27 e CXCL-10 como marcadores de uma resposta do tipo 1 não mostraram diferenças significativas entre os grupos (15C, 15D, respectivamente). Citocinas do tipo 2 ficaram com baixas concentrações séricas nos quatro grupos, no caso de IL-5 (Figura 15E) e IL-13, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 15F). Para completar, nem as quimiocinas avaliadas do tipo 2, tais como CCL11 e CCL17, apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 15G e H), mesmo com concentração elevada de CCL17 no grupo dos indivíduos com carga parasitária maior (≥ 100 opg; Figura 15H). As concentrações séricas da citocina IL-10 foram baixas na maioria dos indivíduos testados e ficaram em baixo do nível de detecção em todos os grupos, principalmente o grupo com carga parasitária ≥ 100 opg (15 I)



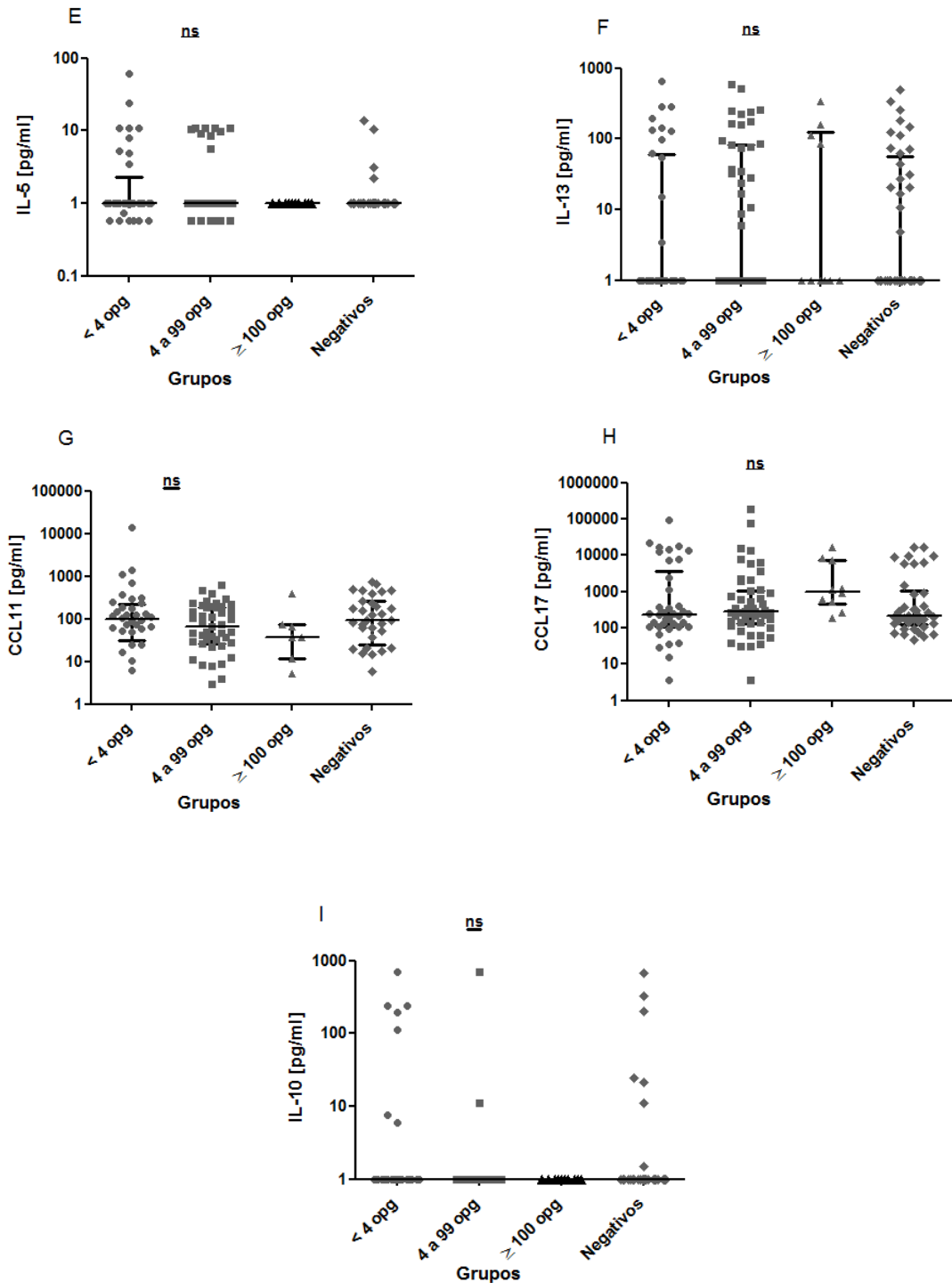


Figura 15 – Concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/ml), indicadas em escala logarítmica (log 10), em soros de indivíduos infectados com *S. mansoni*. Foram divididos em quatro grupos: Grupo 1, indivíduos com carga parasitária extremamente baixa (<4opg) n= 41 ; Grupo 2, indivíduos com carga parasitária baixa (4 a 99 opg), n=56; Grupo 3, indivíduos com carga parasitária moderada a alta (≥100 opg) n=10; Grupo 4, indivíduos ovo-negativos (Negativos) n= 42. Nos gráficos foram indicados as medianas das concentrações por grupo e em pg/ml, junto com os interquartis (25 e 75% dos valores). Foi calculado Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Diferenças não significativas (ns: $p \geq 0,05$) e significativas entre os grupos ($*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$) são indicadas.

Foi analisado a idade de todos os indivíduos em comparação com os marcadores imunológicos, e apenas os marcadores tipo 2 CCL11 e CCL17 obtiveram uma diferença significativa. A quimiocina CCL11, os indivíduos com faixa etária de 0 a 10 anos de idade teve menos concentrações da mesma, comparando-os com os indivíduos mais velhos com faixa etária > 50 anos. Já a quimiocina CCL17 foi maior nas faixas etárias de 11 a 20 anos, comparando-os com os indivíduos mais velhos com faixa etária > 50 anos (Figura 16 A-B)

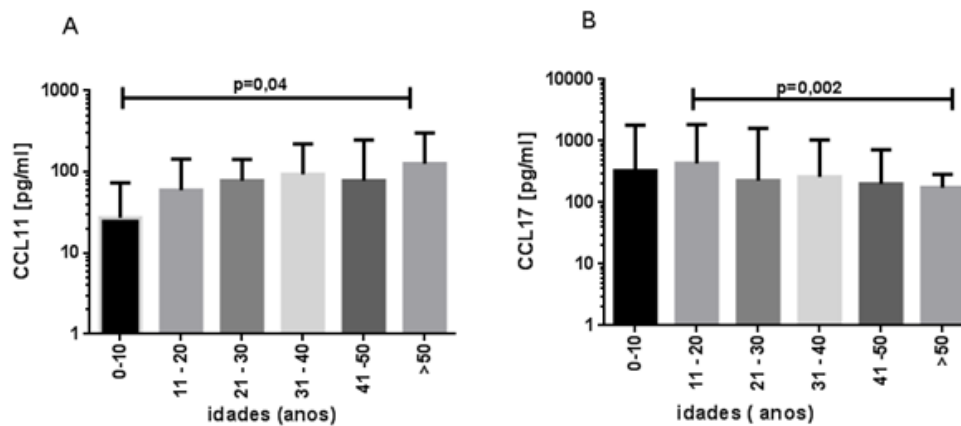


Figura 16- Concentrações de quimiocinas (pg/ml) em comparação com a faixa etária, indicadas em escala logarítmica (log 10), em soros de 149 indivíduos. Nos gráficos foram indicados as medianas, junto com os interquartis (25 e 75% dos valores). Foi calculado Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. com $p < 0,05$.

Para analisar os indivíduos em Respondedores e não- respondedores, foi feito a assinatura das citocinas e quimiocinas. Sendo realizado da seguinte forma: todos os indivíduos dos diferentes grupos foram analisados as concentrações dos marcadores imunológicos e foi feito a mediana dessas concentrações, aqueles indivíduos que tiveram as concentrações das citocinas e quimiocinas acima da mediana foram caracterizados como indivíduos respondedores, já os indivíduos com concentrações abaixo da mediana, foram chamados de não- respondedores, como é mostrado na (tabela 3 a seguir).

Tabela 3 – Porcentagens de indivíduos respondedores e não respondedores, analisado por medianas das concentrações de cada citocinas e quimiocinas (pg/ml).

Citocinas e Quimiocinas (pg/ml), Mediana	Respondedores	Não respondedores
IL-1 β (1 pg/ml)	36,91%	63,08%
IL-6 (5,73 pg/ml)	48,32%	51,67%
IL-17 (1 pg/ml)	8,05%	91,94%
TNF- α (1 pg/ml)	9,39%	90,60%
IL-10 (1 pg/ml)	9,39%	90,60%
IL-27 (666,025)	53,69%	46,30%
CXCL10 (115,137 pg/ml)	51%	49%
IL-5 (1 pg/ml)	10%	89,93%
IL-13 (1 pg/ml)	38,25%	61,70%
CCL11 (79,673 pg/ml)	41,61%	58,38%
CCL17 (245,036 pg/ml)	48,99%	51%

Fonte: Resultados da pesquisa.

5.3 Correlação entre intensidade da infecção por *S. mansoni* e marcadores imunológicos e hematológico no tempo zero

Na correlação da carga parasitária (opg) com marcadores imunológicos, foi feito a correlação pelo teste de Spearman. A interpretação do r é dado por: r =1 correlação perfeita; 0 a 1= as duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir juntas; 0.0 as variáveis não variam em tudo, juntas; 0 a -1 uma variável aumenta, enquanto a outra diminui; -1 correlação inversa. Valores p iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

Com a interpretação acima, e os dados analisados no trabalho, demonstram que não houve correlação, os dados dispersos indicam, que os indivíduos que possuem poucos ovos por grama de fezes têm concentrações altas de determinadas marcadores imunológicos e vice-versa, como mostra a (Tabela 4)

Tabela 4 – Correlação entre marcadores imunológicos no sangue periférico (concentração de citocinas e quimiocinas em pg/ml) e intensidade da infecção (opg) de indivíduos diagnosticados pelo método de Kato-Katz (≥ 4 opg).

4 a 99 e ≥ 100 opg	
pg/ml	opg r (p)
IL-1 β	0,1 (0,23)
IL-6	0,010 (0,93)
TNF- α	0,15 (0,22)
IL-17	0,01 (0,93)
IL-27	0,17 (0,17)
CXCL10	0,20 (0,12)
IL-5	-0,22 (0,11)
IL-13	0,13 (0,30)
IL-10	-0,15 (0,22)
CCL11	-0,12 (0,38)
CCL17	0,20 (0,11)

Fonte: Resultados da pesquisa.

Também foram analisadas as correlações entre as citocinas e quimiocinas, pelo teste de Spearman. No grupo < 4 opg resultaram correlações positivas entre CXCL10 e IL-10 e também entre IL-6 e IL-5 (Tabela 5). No grupo 4 a 99 opg, uma correlação positiva foi detectada entre IL-6 e IL-10 e uma correlação negativa resultou para CXCL10 e IL-13 (Tabela 6). No grupo dos Negativos teve correlação positiva entre IL-6 e CXCL10 e correlação negativa entre IL-5 e CCL17 (Tabela 7). Por fim, no grupo ≥ 100 opg não foram observados correlações significativas entre os marcadores imunológicos.

Tabela 5 – Correlação entre as citocinas e quimiocinas no grupo < 4 opg (n=41). Foi calculado o valor r após teste de Spearman para cada combinação e valores p foram indicados em parênteses, com valores $p \leq 0,05$ considerados significativos.

Grupo < 4 opg								
(pg/ml)	IL-10	IL-6	CXCL10	IL-27	IL-5	IL-13	CCL11	CCL17
	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)
IL-10		0,23 (0,22)	0,43 (0,005)	0,09 (0,55)	-0,13 (0,4)	-0,21 (0,21)	0 (1)	-0,25 (0,13)
IL-6			0,12 (0,49)	0,17 (0,36)	0,32 (0,05)	0,13 (0,47)	0,18 (0,29)	-0,06 (0,68)
CXCL10				0,22 (0,17)	0,10 (0,54)	-0,06 (0,71)	0,18 (0,29)	-0,06 (0,68)
IL-27					-0,25 (0,13)	0,27 (0,10)	0,07 (0,68)	-0,15 (0,35)
IL-5						-0,15 (0,37)	-0,1 (0,34)	-0,25 (0,13)
IL-13							-0,08 (0,6)	0,25 (0,14)
CCL11								0,10 (0,55)

Fonte: Resultados da pesquisa.

Tabela 6 – Correlação entre as citocinas e quimiocinas no grupo 4 a 99 opg (n=56). Foi calculado o valor r após teste de Spearman para cada combinação e valores p foram indicados em parênteses, com valores p ≤ 0,05 considerados significativos.

Grupo 4 a 99 opg								
(pg/ml)	IL-10	IL-6	CXCL10	IL-27	IL-5	IL-13	CCL11	CCL17
	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)
IL-10		0,29 (0,04)	-0,03 (0,79)	-0,10 (0,46)	-0,05 (0,7)	-0,19 (0,18)	-0,11 (0,44)	-0,09 (0,49)
IL-6			0,07 (0,63)	0,09 (0,52)	0,002 (0,98)	-0,07 (0,61)	-0,006 (0,96)	-0,20 (0,17)
CXCL10				-0,001 (0,99)	-0,06 (0,65)	-0,40 (0,004)	-0,1 (0,49)	-0,07 (0,61)
IL-27					-0,09 (0,52)	0,20 (0,17)	0,15 (0,29)	-0,03 (0,82)
IL-5						-0,01 (0,91)	-0,02 (0,85)	-0,20 (0,17)
IL-13							0,20 (0,19)	0,09 (0,54)
CCL11								0,19 (0,19)

Fonte: Resultados da pesquisa.

Tabela 7 – Correlação entre as citocinas e quimiocinas no grupo Negativos (n=42). Foi calculado o valor r após teste de Spearman para cada combinação e valores p foram indicados em parênteses, com valores p ≤ 0,05 considerados significativos.

Grupo Negativos								
(pg/ml)	IL-10	IL-6	CXCL10	IL-27	IL-5	IL-13	CCL11	CCL17
	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)
IL-10		0,16 (0,36)	0,12 (0,45)	0,24 (0,13)	0,14 (0,39)	0,15 (0,35)	-0,26 (0,14)	0,03 (0,82)
IL-6			0,45 (0,006)	0,03 (0,83)	-0,01 (0,91)	-0,14 (0,39)	-0,01 (0,95)	-0,12 (0,49)
CXCL10				-0,04 (0,78)	0,01 (0,90)	-0,005 (0,97)	-0,22 (0,20)	0,01 (0,91)
IL-27					-0,02 (0,89)	-0,02 (0,85)	-0,22 (0,20)	0,13 (0,41)
IL-5						-0,07 (0,66)	-0,21 (0,23)	-0,39 (0,01)
IL-13							-0,01 (0,91)	0,12 (0,47)
CCL11								0,16 (0,35)

Fonte: Resultados da pesquisa.

No Tempo zero foram feitos hemogramas dos participantes para verificar a alteração da composição das células brancas durante a infecção por *S. mansoni* e em relação à carga parasitária. Foi feito a contagem de leucócitos totais, neutrófilos e eosinófilos nos grupos com carga parasitária extremamente baixa <4 opg (n=41); grupo com carga parasitária baixa, opg de 4 a 99 (n=56); grupo com carga parasitária moderada a alta, opg ≥ 100 (n=11) e grupo de

ovo-negativos (Negativos n=42). A análise estatística da composição de células brancas no sangue periférico dos diferentes grupos, não revelou diferenças significativas em concentrações de leucócitos, neutrófilos, ou eosinófilos (Figura 17A-C, respectivamente). Para leucócitos totais e neutrófilos, poucos indivíduos tinham concentrações que ultrapassavam os níveis normais apresentados (Figura 17 A-B). Já para eosinófilos houve vários indivíduos com eosinofilia nos diferentes grupos avaliados, mas sem diferença significativa (Figura 17C). Dentro do Grupo de 4 a 99 opg houve os indivíduos com eosinofilia mais acentuada. Em geral, as porcentagens de indivíduos com eosinofilia, nos grupos < 4 opg, , 4 a 99 opg, ≥ 100 opg e Negativos variaram de 36,58%, 28,57%, 54,54% e 33,33%, respectivamente.

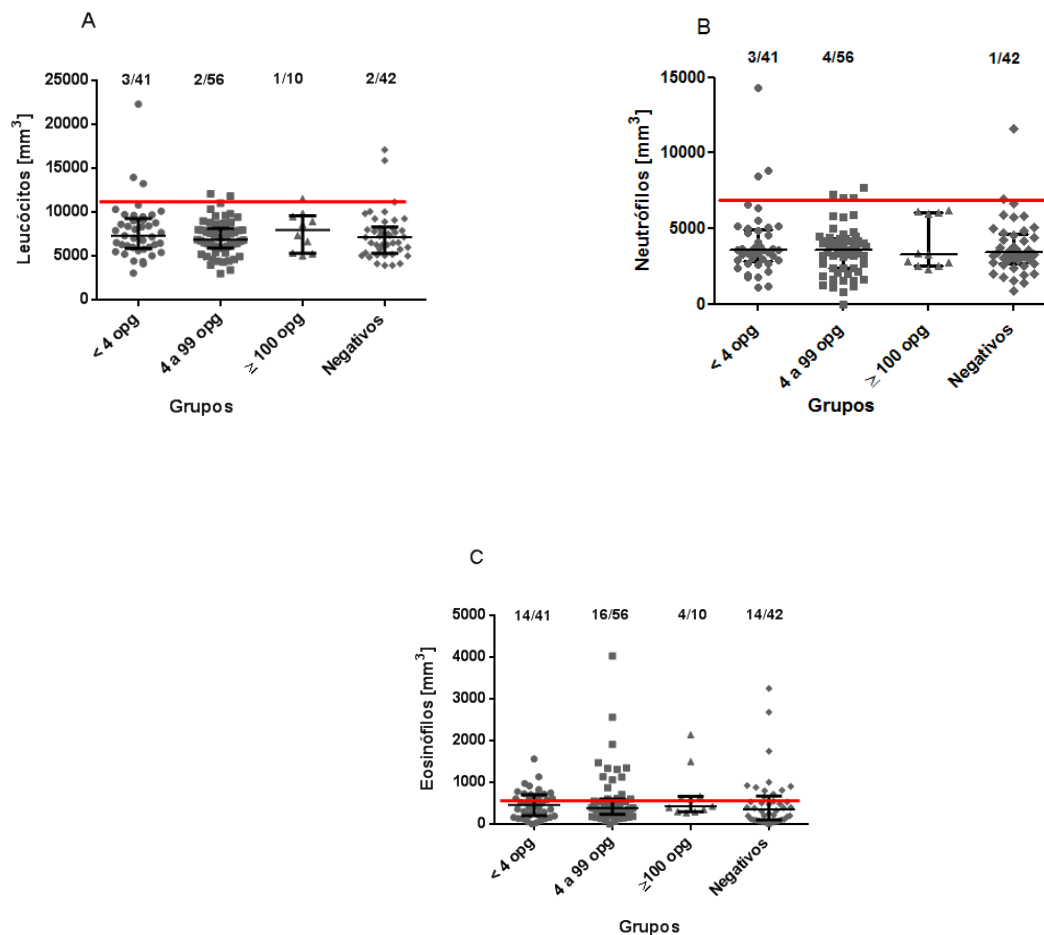


Figura 17 – Concentrações de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos (mm^3) no sangue periférico de indivíduos infectados ou não por *S. mansoni*. Os indivíduos foram classificados em Grupo 1, < 4 opg (n=41), Grupo 2, 4 a 99 opg (n=56), Grupo 3, ≥ 100 opg (n=10) e Grupo 4, indivíduos ovo-negativos (Negativos, n=42). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. A linha em vermelho indica o limite da concentração normal para cada população de células avaliadas. Para leucócitos ($3600\text{--}11000 \text{ mm}^3$), neutrófilos ($2000\text{--}7000 \text{ mm}^3$) e eosinófilos ($0\text{--}500 \text{ mm}^3$). Os números acima no gráfico, indicam a quantidade de indivíduos por grupo, que tiveram concentrações acima do esperado em cada população de células.

Fonte: Resultados da pesquisa.

Com intuito de avaliar alterações da composição de células brancas no sangue periférico de indivíduos infectados e a associação das alterações com a carga parasitária, foram feitas hemogramas completas dos participantes infectados com *S. mansoni* no primeiro tempo zero do estudo e identificados pelo método de Kato-Katz.

Na comparação das células de defesa, com a contagem de ovos por grama de fezes foi separado os Grupos (4 a 99 opg) e (≥ 100 opg). No Grupo 4 a 99 opg, não foi constatada associação entre ovos por grama de fezes (opg) e eosinófilos, verificado pela Regressão linear (Figura 18A). O grupo ≥ 100 opg verificou a associação entre opg e a eosinofília, quanto maior a carga parasitária, maiores foram às concentrações de eosinófilos no sangue (Figura 18B).

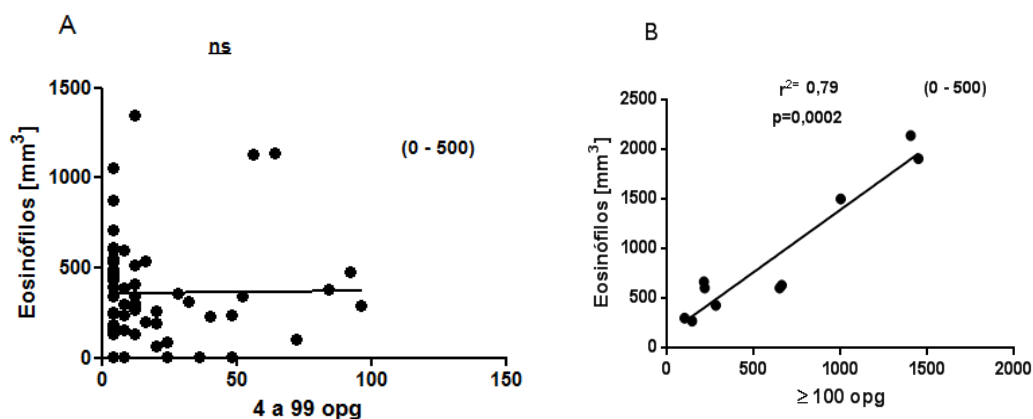


Figura 18 – Associação entre a concentração de eosinófilos (0-500 mm³) com a contagem de ovos por grama de fezes (opg), nos Grupos com >4 a 99 opg (n=56) e ≥ 100 opg (n=10). Os dados foram analisados pelo teste de Regressão Linear, com significância de * $p \leq 0,05$ (ns = não significativo).

Fonte: Resultados da pesquisa.

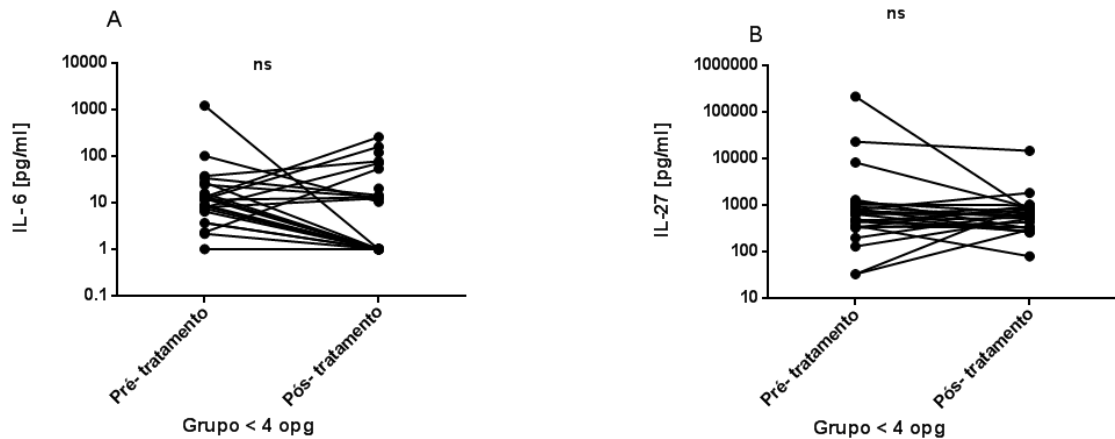
5.4 Seguimento do estudo: comparação de marcadores imunológicos do tempo zero com Tempo 3 meses pós-tratamento

O tratamento com o quimioterápico praziquantel foi aplicado em 84 indivíduos considerados positivos para *S. mansoni* nos exames parasitológicos de fezes realizados no

Tempo zero, ocorrendo após o tratamento, exatamente 3 meses, uma nova avaliação com exames parasitológicos de fezes, no intuito de verificar uma possível reinfecção. Todos os pacientes medicados permaneceram ovo-negativos após tratamento nos exames parasitológicos de fezes, sendo pequeno o risco de reinfecção. Desses pacientes, foram realizadas as dosagens de citocinas e quimiocinas.

Três meses pós-tratamento, o grupo com carga parasitária extremamente baixa continuava com concentrações não detectáveis de alguns marcadores tipo 1 e Th17, no sangue periférico, tais como IL-1 β , TNF- α , IL-17 (dados não mostrados).

Concentrações séricas de IL-6 e da quimiocina CXCL10 diminuíram no pós-tratamento, enquanto a citocina IL-27 manteve as suas concentrações no pós- tratamento (19A,19B, 19C). Os marcadores Tipo 2, IL-5 e IL-13 aumentaram no pós- tratamento, comparando com o pré-tratamento, e CCL17 apresentou diminuição das suas concentrações no pós-tratamento (19D,19E,19F). A IL-10 obteve um pequeno aumento no pós-tratamento. Porém, todas essas alterações no perfil imunológico não apresentaram diferenças significativas (19G). Ao contrário das concentrações de CCL11, que aumentaram significativamente três meses pós-tratamento, apresentando uma diferença significativa de $p = 0,01$ (Figura 19H).



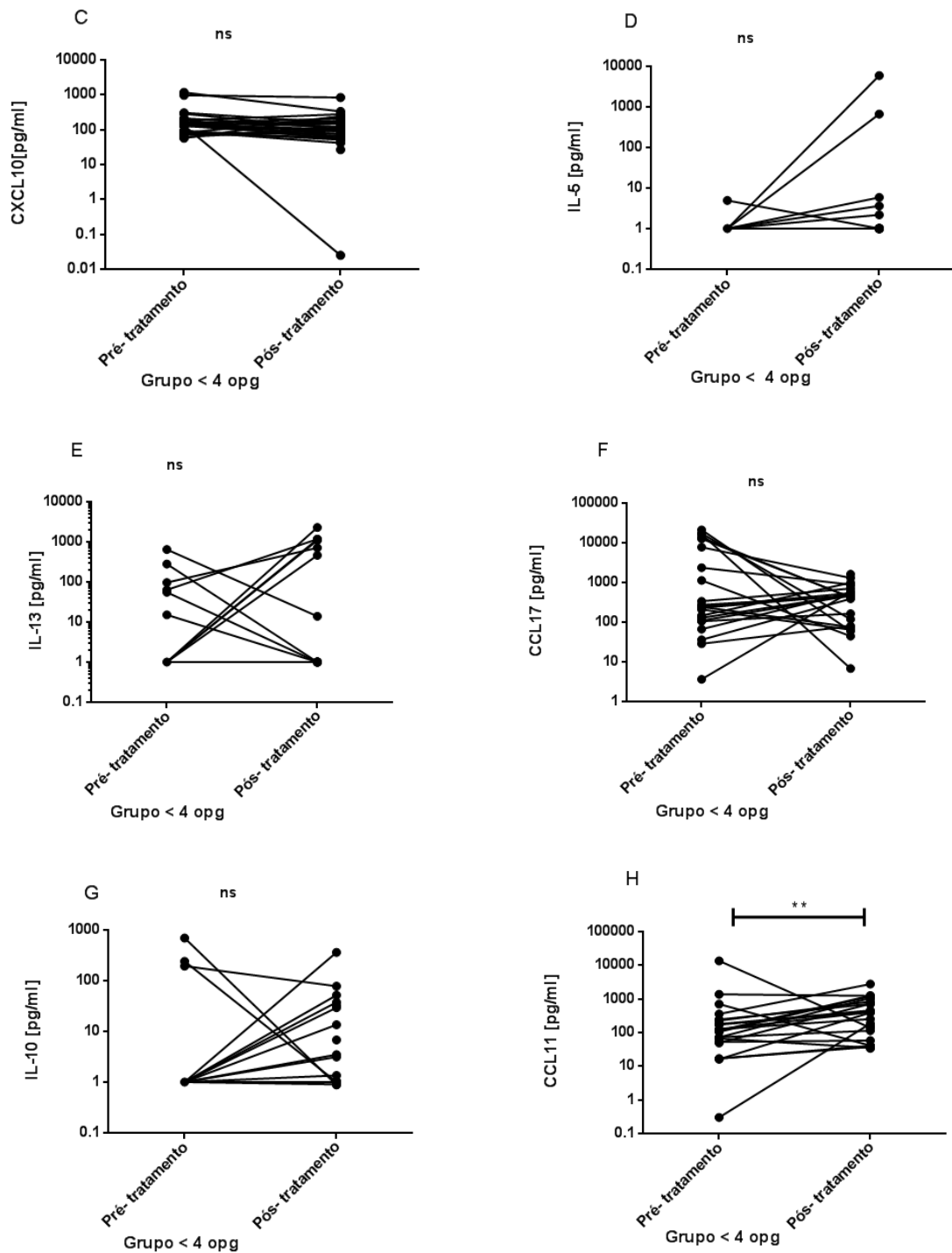


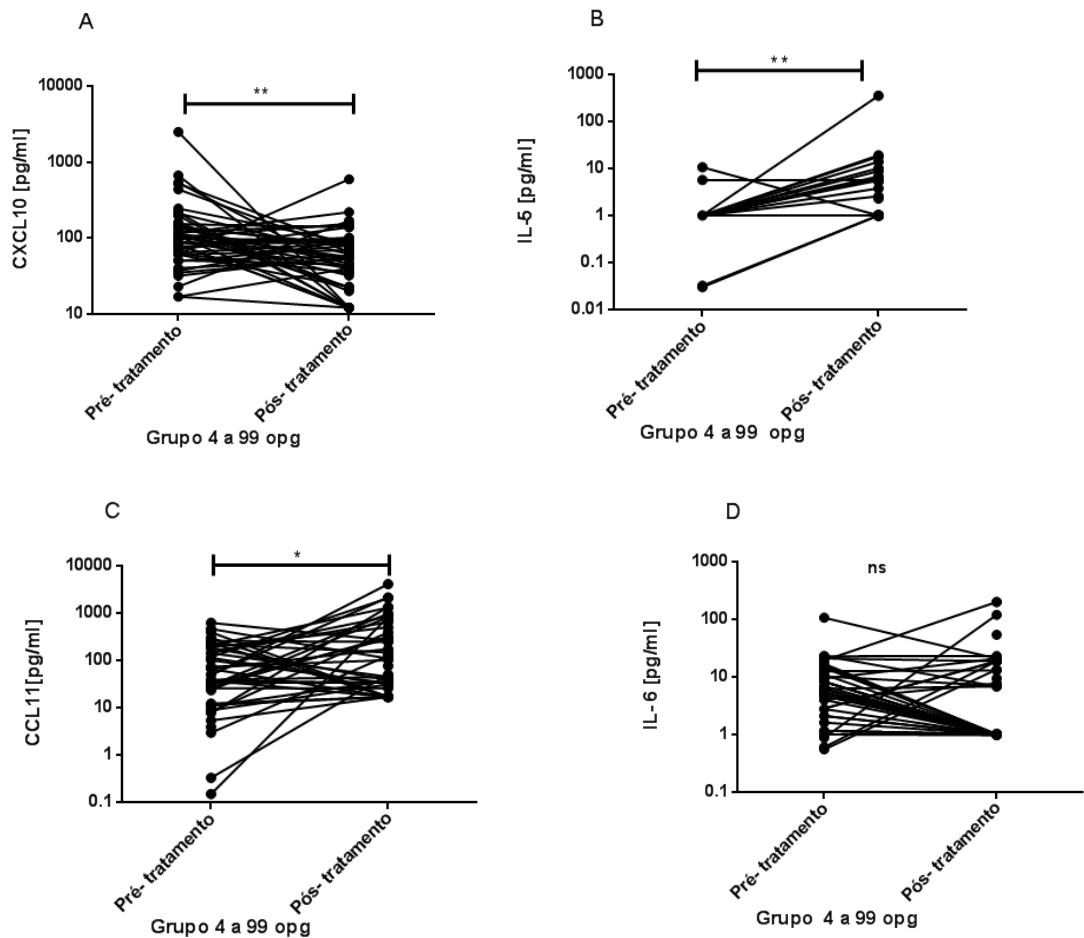
Figura 19 – Comparação nas concentrações séricas de citocinas e quimiocinas (pg/ml), na escala logarítmica(log 10), no Tempo zero (pré- tratamento com n=27) e Tempo 3 meses (pós – tratamento com n=27), no grupo < 4 opg. Os dados foram analisados pelo de Wilcoxon pareado, com significância de * $p < 0,05$, ** $p=0,01$ e sem significância (ns = $p > 0,05$)

Fonte: Resultados da pesquisa.

No Grupo 4 a 99 opg, observamos que os marcadores tipo 1 e Th17, (IL-1 β , TNF- α , IL-17), mantiveram suas concentrações baixas, próximo ao nível de detecção (dados não mostrados).

A concentração sérica do marcador Tipo 1, CXCL10 diminuiu após o tratamento, com diferença significativa, quando comparado com os níveis antes do tratamento ($p= 0,005$) (Figura 20A). Da mesma forma, os marcadores Tipo 2, IL-5 e CCL11, obtiveram as concentrações séricas significativamente aumentadas no pós-tratamento ($p= 0,03$ e $p= 0,003$, respectivamente) (Figuras 20B, 20C).

As concentrações do marcador tipo 1 IL-6, diminuíram no pós-tratamento, (figura 20D), enquanto o IL-27, manteve suas concentrações séricas no pós-tratamento (figura 20E) e o IL-10 permaneceu em níveis baixos no pós- tratamento (figura 20F). Por fim, os marcadores da resposta do tipo 2, IL-13 e CCL17, não apresentaram alterações significativas antes ou após o tratamento (figura 20G -H).



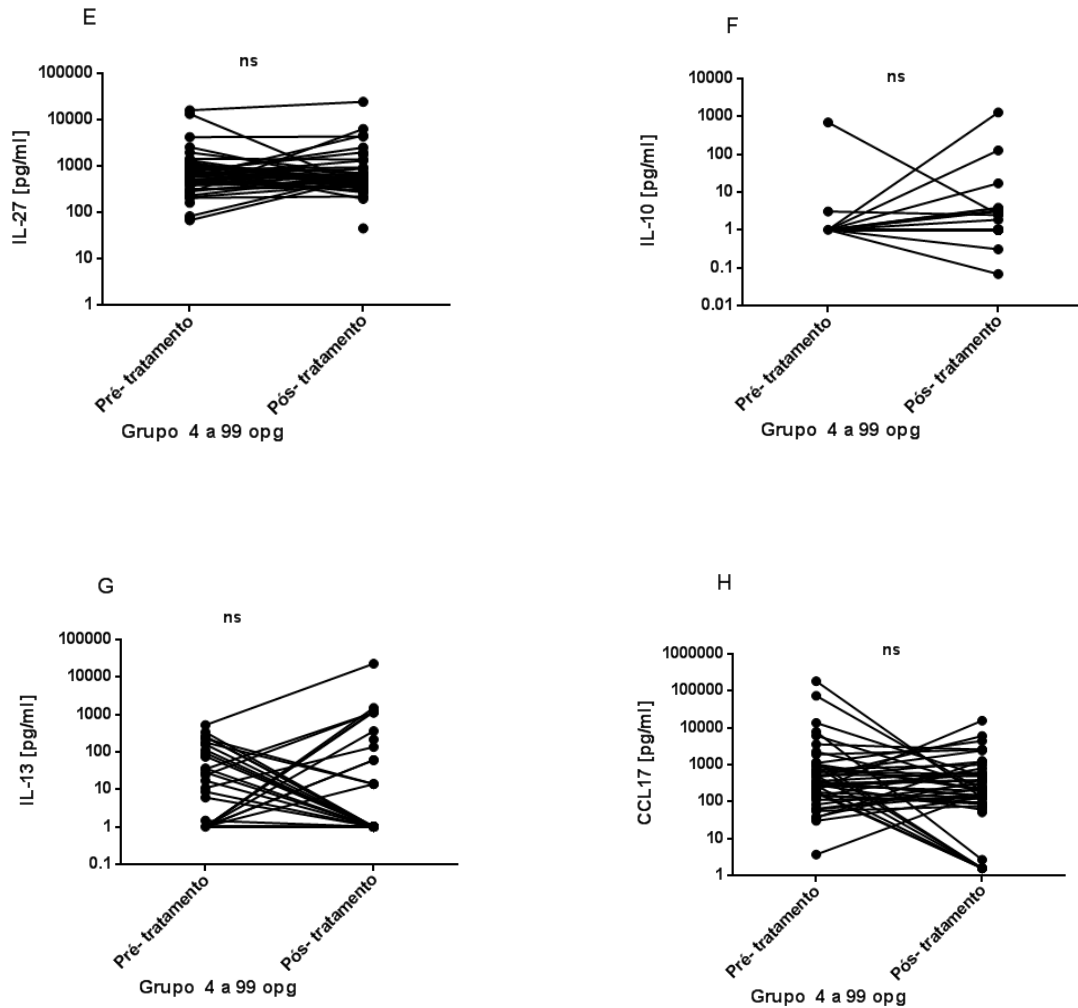
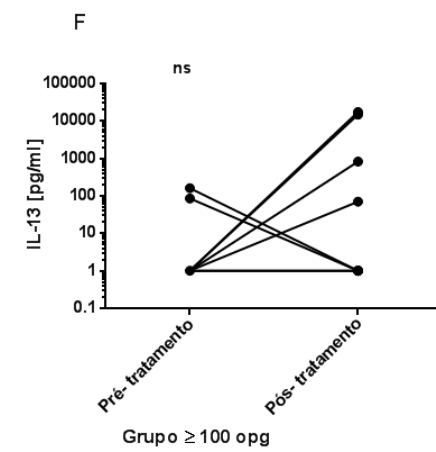
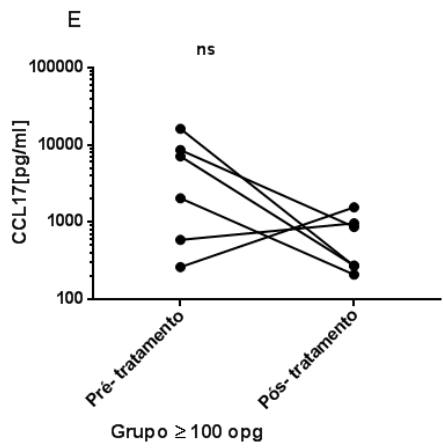
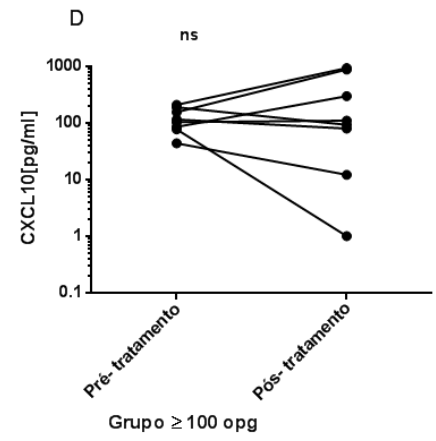
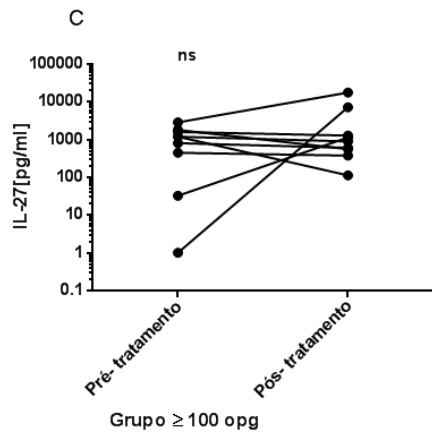
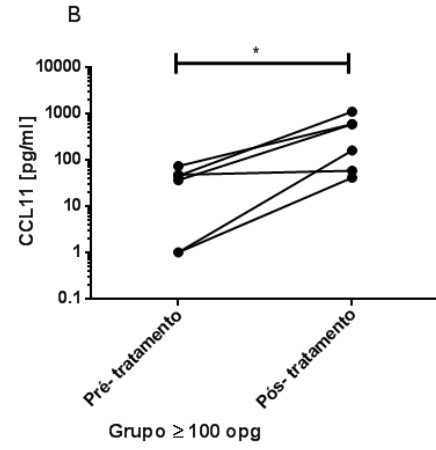
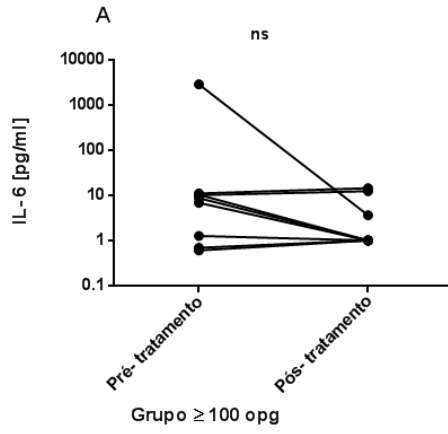


Figura 20 – Comparação nas concentrações séricas de citocinas e quimiocina (pg/ml) com escala de log 10, no (Tempo zero com n= 49) e Tempo 3 meses (pós – tratamento com n= 49), no grupo 4 a 99 opg. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon pareado, com significância de * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$ e sem significância (ns = $p \geq 0,05$).**

Fonte: Resultados da pesquisa.

No Grupo ≥ 100 opg, observamos que alguns marcadores tipo 1 e Th17, (IL-1 β , TNF- α e IL-17), estabeleceram-se no limite da detecção, com concentrações mínimas no soro dos indivíduos pós-tratamento (dados não mostrados). O marcador tipo 1 IL-6 diminuiu suas concentrações no pós-tratamento, porém, sem diferença significativa (Figura 21A). Já a quimiocina CCL11, apresentou um aumento significativo ($p=0,03$) no pós-tratamento (Figura 21B). Os marcadores do tipo 1, como IL-27 e CXCL10, mantiveram suas concentrações séricas no pós-tratamento (Figuras 21C e D). Da mesma forma, não resultaram diferenças significativas para os marcadores do tipo 2 no período antes e pós-tratamento (Figuras 21E, F e G).



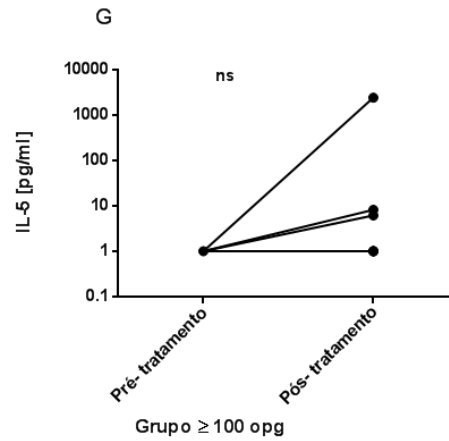


Figura 21 – Comparação nas concentrações séricas de citocinas e quimiocinas (pg/ml), com escala logarítmica (log10), no Tempo zero (pré- tratamento com n=8) e Tempo 3 meses (pós – tratamento com n= 8), no grupo ≥ 100 opg. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon pareado, com significância de * $p \leq 0,05$. (ns $p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo principal, a avaliação de marcadores imunológicos no sangue periférico de indivíduos com carga parasitária extremamente baixa (< 4 opg) na infecção por *S. mansoni*. Estes indivíduos, pelos procedimentos comuns do PCE e o uso do método de Kato-Katz, normalmente não são diagnosticados como pessoas infectadas e são considerados normais endêmicos. Porém, aplicando métodos mais sensíveis, foi demonstrado que uma boa parte dessa população na verdade é infectado com *S. mansoni* (Oliveira, 2015).

A zona rural dos córregos Pé da Serra, Tocantins e Santana no Distrito de Brejo do Amparo, possui uma população fixa, com cerca de 270 pessoas. A última intervenção do PCE, com exames de Kato-Katz e tratamento contra a esquistossomose em pessoas infectadas foi conduzida na região aproximadamente 2 anos antes do início do projeto em fevereiro de 2014. No trabalho de Oliveira, 2015, foram feitos diversos e extensos exames parasitológicos de fezes (Kato-Katz, Gradiente salino e Helmintex®), sendo uma caracterização parasitológica bastante minuciosa, mostrando que é uma área onde há predominância de indivíduos com carga parasitária baixa, porém, é uma região com prevalência é de 45,9%.

A população utilizada no presente trabalho, possui uma caracterização conhecida no aspecto da infecção pelo *S. mansoni* e de outras parasitoses intestinais. No presente trabalho, 197 indivíduos foram incluídos no estudo do perfil imunológico, sendo 118 positivos para *S. mansoni* e 79 indivíduos ovo-negativos para a esquistossomose mansônica. A divisão dos participantes ocasionou na formação de 4 grupos para análises e comparações, sendo eles dependentes da presença de ovos e da carga parasitária: indivíduos ovo-negativos (Negativos); com carga extremamente baixa (< 4 opg); com carga baixa (4 a 99 opg) e por fim, indivíduos com carga parasitária média a alta (≥ 100 opg). Os últimos dois grupos, foram classificados conforme as diretrizes da OMS (WHO, 2002).

A intensidade da infecção nos indivíduos positivos pelo método de Kato-Katz, se apresentou maior em crianças na primeira década de vida, decaindo com o passar dos anos de vida, mas com cargas parasitárias consideradas baixas e sem diferenças significativas nas diferentes faixas etárias. Já a prevalência, apresentou-se maior na segunda década de vida. Vários trabalhos publicados em diferentes áreas endêmicas no mundo, mostraram uma maior prevalência e intensidade da infecção em crianças e adolescentes, com o pico na segunda

década de vida e a menor prevalência e intensidade da infecção em indivíduos maiores de 50 anos (King *et al.*, 1988; De Stigter *et al.*, 1989; Webster *et al.*, 1998; Bethony *et al.*, 2001).

Em contraste, no grupo com carga parasitária extremamente baixa, as maiores prevalências resultaram na primeira década de vida e nas faixas etárias mais velhas, contrapondo o perfil dos indivíduos com carga parasitária maior. Essas características são argumentadas por estudos, mostrando que crianças e adolescentes não possuem uma exposição constante ao parasito e ainda não possuem um acúmulo maior de vermes adultos no indivíduo (Stothard *et al.*, 2011; Bustinduy *et al.*, 2013). Já indivíduos com idade maior que 50 anos, possuem uma resposta imunológica efetiva, devido à grande exposição no passar dos anos e a vários tratamentos quimioterápicos, induzindo uma imunidade adquirida que regula a quantidade de vermes adultos e reinfeções para um nível mais baixo, mesmo ocorrendo prevalências elevadas em pessoas mais idosas (Silveira *et al.*, 2002; Bonnard *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2006). Além de fatores externos e de exposição, prevalências altas em crianças nos primeiros anos de vida podem ser facilitadas devido à exposição intra-uterina de mães infectadas com *S. mansoni* ou pós nascimento com o leite materno, ocorrendo assim, exposição inicial aos antígenos do parasito que provoca uma reação imunológica diferente das daqueles indivíduos que não moram em regiões endêmicas (Attalah *et al.*, 2003). Outra explicação, seria que indivíduos mais idosos, além de terem uma experiência imunológica maior e resposta imune mais efetiva, provavelmente, alojam uma população de vermes adultos também mais velhos que, ao longo dos anos de infecção, perdem a fertilidade, assim, o número de ovos depositados na circulação diminui, em sequência, o número de ovos eliminados nas fezes (Silveira *et al.*, 2002).

A área de estudo foi escolhida, pois se qualifica nos atuais estudos do perfil epidemiológico da esquistossomose no Brasil, com a diminuição da transmissão e infecção da esquistossomose mansônica. No contexto atual do Brasil, a maior parte das áreas endêmicas que estão sendo controladas pelo PCE, possui uma população de carga parasitária baixa (Wilson *et al.*, 2007), dificultando o diagnóstico. Portanto, é necessário o uso de métodos diretos e/ou indiretos mais sensíveis para o diagnóstico da doença. Dessa forma, o uso de marcadores imunológicos, como indicadores indiretos, pode revelar o estado de pacientes na fase aguda ou crônica da infecção pelo *S. mansoni* (Grenfell *et al.*, 2013).

O homem vive em constante exposição à patógenos de diferentes tipos, entre eles bactérias, fungos, vírus e parasitas. Assim, o sistema imunológico fica constantemente em alerta, tentando combater e eliminar os patógenos de diferentes classes de organismos. A

relação entre o homem e os helmintos não é diferente, sendo as células T auxiliaadoras do tipo 2, responsáveis por um desvio da resposta imune e para uma ativação de mecanismos de destruição de helmintos e dos seus diferentes estágios. Os micróbios são infinitamente menores e provocam uma resposta inflamatória exacerbada e rápida para a sua eliminação. Em contrapartida os helmintos são maiores, promovendo uma resposta imunológica mais fraca. Com a capacidade de driblar a resposta imune e desviar e escapar de mecanismos efetores, as infecções helmínticas geralmente são crônicas, pois, podem demorar algum tempo até o hospedeiro ser capaz de desenvolver certa imunidade contra novas infecções (Maizels *et al.*, 2003).

Várias espécies dos filos de Platelminhos e Nematódeos podem parasitar seres humanos e provocar doenças crônicas. Esses parasitos provocam no hospedeiro uma resposta imunológica similar. Geralmente é uma resposta que envolve vários mecanismos como a produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, várias classes de imunoglobulinas como IgE e IgG4 e a indução e proliferação de células efetoras, tais como eosinófilos, basófilos e outras, sendo uma resposta notavelmente Tipo 2, que é bastante documentado e reafirmado (Finkelman *et al.*, 1991; Maizels *et al.* 1993).

Na infecção pelo *S. mansoni*, a fase aguda é caracterizada por uma resposta imune do tipo 1, resultando na ativação de células para a secreção de citocinas como IL-2 e IFN- γ . Com a evolução da doença e o começo da oviposição nos tecidos, ocorre uma polarização da resposta imune predominantemente para um perfil tipo 2 (Zaccone *et al.*, 2009).

Com os conhecimentos acima, foram dosados no Tempo zero, pré-tratamento, marcadores da resposta imune tipo 1 e tipo 2, marcador Th17 e de regulação. No grupo com carga parasitária extremamente baixa (< 4 opg), as concentrações séricas dos marcadores tipo 1, IL-1 β e TNF- α foram baixas em comparação com os demais grupos, em especial em comparação com o grupo com carga parasitária maior (\geq 100 opg). O trabalho de Coutinho *et al.* (2006) mostrou, que uma elevada produção de citocinas inflamatórias esta associado à infecções com cargas parasitárias altas e também em casos clínicos mais graves, como, por exemplo, intensa fibrose hepática.

A citocina IL-17 é preferencialmente produzida por um conjunto de linfócitos T, chamadas células Th17, que realizam parte da defesa contra micróbios e doenças inflamatórias crônicas (Gu *et al.*, 2013). Uma maior produção de IL-17, pode ocasionar uma intensa inflamação e danos aparentes nos tecidos, associada às patologias mais graves em modelos murinos e em humanos (Mbow *et al.*, 2013). As células T CD4, não primadas

(naive), são ativadas e diferenciam-se em células Th17, devido a estímulos por várias citocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β (Korn *et al.*, 2009). Em infecções com *S. japonicum*, foi demonstrado que os antígenos dos ovos podem induzir a produção da citocina IL-17, que promove o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (Zhang *et al.*, 2012). No presente trabalho, a dosagem do marcador Th17(IL-17), no sangue periférico foi mínimo e no limite de detecção nos indivíduos dos quatro grupos analisados. Em contrapartida, IL-27 como marcador de resposta do tipo 1, apresentou concentrações séricas prontamente detectadas em indivíduos de todos os grupos. Em modelos murinos, é relatado que a citocina IL-27 tem grande capacidade de regular a resposta imune, com a capacidade de suprimir diretamente a diferenciação de IL-17 (Batten *et al.*, 2008).

A quimiocina CXCL10 foi descrita como marcador de processos inflamatórios do tipo 1 e está sob controle genético de IFN- γ (Saha *et al.*, 2010). No presente trabalho, não houve dosagem da citocina IFN- γ , pois, no sangue periférico ocorrem dificuldades para sua detecção. Nos indivíduos investigados, concentrações séricas de CXCL10 foram detectáveis, mas com concentrações semelhantes entre os grupos dos infectados e os indivíduos ovo-negativos. Esses dados, podem ser indicadores de que a maior parte da população, não possui uma patologia grave, pois pacientes com níveis altos de IFN- γ possuem baixos níveis de fibrose (Kovacs *et al.*, 1991; Henri *et al.*, 2002). Infecções experimentais em modelos murinos, comprovaram que essa relação inversa entre mediadores de uma resposta do tipo 1 e fibrose hepática ocorre (Czaja *et al.*, 1989). Exames de ultrassonografia, feitos nos indivíduos com esquistossomose mansônica corroboram com esses resultados. Com isso, foram feitos, um total de 83 exames de ultrassonografia em pacientes diagnosticados com esquistossomose. Desses, apenas 11 indivíduos, apresentaram alterações hepáticas com fibrose leve e 6 pessoas com fibrose moderada, mostrando então a ausência de casos clínicos mais graves na população (Geiger 2016, comunicação pessoal). Além disso, como a dosagem de CXCL10, que poderia ser usado como marcador substituto de IFN- γ , os indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni* não apresentaram um perfil imunológico tipicamente do tipo 2, como esperado para fase crônica da esquistossomose (Pearce & MacDonald, 2002). Um perfil misto, sem um aumento de marcadores de inflamação no mesmo tempo, poderia reforçar os achados resumidos por Caldas e colaboradores (2008), que mostraram em indivíduos com carga parasitária baixa, a não ocorrência da supressão da resposta imune do tipo 1, não sendo possível medir um aumento de marcadores de inflamação (Caldas *et al.*, 2008).

A maior diferença observada no grupo com carga parasitária extremamente baixa (< 4 opg) foi a maior concentração sérica de IL-6, em relação aos Negativos e ao grupo 4 a 99 opg, esses dados mostram que há um processo de inflamação ativa nesse grupo. A indução de uma resposta imune, com a participação de marcadores de inflamação, foi relatada em indivíduos sintomáticos na fase crônica da infecção (Caldas *et al.*, 2000; Pearce; MacDonald, 2002; WHO, 2009). Por outro lado, a citocina IL-6 foi o único marcador que se apresentou elevado em soros de indivíduos com opg < 4. Neste grupo, apesar da carga parasitária extremamente baixa, foram encontradas coinfeções com protozoários intestinais em 41,66% dos indivíduos. Infecções intestinais por *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica/díspar*, podem ser assintomáticas ou prejudiciais à saúde, e podendo provocar alterações no intestino, além de provocar uma resposta imune do tipo 1 (Coutinho-Azevedo *et al.*, 2015). Assim, protozoários intestinais, poderiam contribuir para um perfil imunológico misto, como foi observado no presente estudo, ou até ter causado uma inflamação intestinal. Entretanto, uma população exposta a diversos patógenos e estímulos antigênicos, pode apresentar um perfil imunológico que não seja exclusivamente devido à infecção por *S. mansoni*, portanto, há dificuldade na análise de marcadores imunológicos específicos.

A concentração de IL-5 no soro, foi baixa nos quatro grupos, sendo uma citocina que a sua expressão é essencial para a produção de eosinófilos (Moore *et al.*, 1997; Negrão-Corrêa *et al.*, 2014). Outro marcador da resposta tipo 2 é a IL-13, que é uma citocina responsável pelo recrutamento de células para o local da inflamação, induzindo a formação do granuloma ao redor dos ovos depositados e participando de processos fibróticos em uma fase mais avançada da infecção (Wynn *et al.*, 2004). O trabalho de Schwartz *et al.* (2014), demonstrou que camundongos deficientes de IL-4/IL-13 morreram durante a fase aguda da infecção pelas reações inflamatórias exacerbadas. No presente trabalho, não houve diferenças significativas entre os grupos pesquisados, mas foi observado, que havia presença em cada grupo de pessoas com uma produção considerável de IL-13, enquanto em outros indivíduos não foi possível detectar IL-13. Nesse contexto, estudos com PBMC (células mononucleares do sangue periférico), demonstraram que indivíduos considerados altos produtores de IL-13 possuem uma chance maior de apresentar alterações fibróticas no fígado (Henri *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2005). Porém, isso não corroborou com o nosso estudo, devido ao estado clínico assintomático dos indivíduos e dos resultados da ultrassonografia (Geiger, 2016, comunicação pessoal). Como marcadores suplementares de uma resposta imune do tipo 2, foram avaliadas as quimiocinas CCL11 e CCL17. Concentrações séricas dessas quimiocinas foram detectadas em todos os grupos em nível semelhante. Porém, no grupo com maior carga

parasitária houve uma tendência de concentrações elevadas, especialmente nos dois indivíduos com alta carga parasitária com mais de mil ovos por grama de fezes. As quimiocinas CCL11 e CCL17, foram indicadas anteriormente como marcadores importantes de infecções helmínticas, no caso, em indivíduos mono-infectados com *S. mansoni* e co-infectado com *S. mansoni* e geohelmintos e com cargas parasitárias médias a altas (Geiger *et al.*, 2013).

Em relação a citocina IL-10, trabalhos de Oliveira *et al.* (2005) e Silveira *et al.* (2004) mostraram que a produção da citocina IL-10 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), está correlacionada com a alta intensidade da infecção. Porém, no presente trabalho com citocinas séricas, não houve correlação positiva entre carga parasitária e a concentração de IL-10 em indivíduos infectados e na maioria dos participantes a produção de IL-10 foi baixa. O perfil imunológico pouco alterado nos grupos infectados, pode ser explicada pelo número baixo de indivíduos com carga parasitária elevada de *S. mansoni*. Além disso, a presença de coinfeções com helmintos e/ou protozoários nos grupos, pode ter alterado o perfil em cada grupo. Coinfeções com protozoários podem provocar o aumento da resposta tipo 1, aumentar a produção de INF- γ e suprimir a produção de IL-10 (Bacellar *et al.*, 2002).

Em áreas de baixa endemicidade, a carga parasitária não foi um fator primordial para o desenvolvimento de patologias mais graves da esquistossomose mansônica (Andrade, 2008). Contudo, as citocinas e quimiocinas poderiam ser importantes para se entender a imunopatologia de infecções mais graves, sem ocorrer necessariamente uma relação com a carga parasitária.

A contagem de leucócitos no sangue periférico dos indivíduos, não revelou diferenças entre os grupos e a maioria dos valores ficou dentro dos níveis normais, também indicando a ausência de casos agudos, como foi demonstrado em estudos anteriores (Caldas *et al.*, 2008). Trabalhos experimentais, provaram a importância dos eosinófilos durante a formação dos granulomas e uma participação menor de neutrófilos (Moore *et al.*, 1997). Portanto, eosinófilos são consideradas células importantes para a formação do granuloma e na indicação de uma infecção com processos inflamatórios nos tecidos, além de ter uma relevância no controle de reinfecções. Dentro dos grupos dos indivíduos infectados, foram identificados indivíduos que apresentaram eosinofilia, mas a maioria dos indivíduos apresentaram níveis normais de eosinófilos. A eosinofilia, portanto, não é um estado obrigatório na esquistossomose e muito menos em indivíduos com carga parasitária reduzida. Estudos experimentais, indicaram que eosinófilos podem ser ativados e atraídos por citocinas

do tipo 2, tais como IL-4, IL-10, IL-13, IL-9, IL-21 e outras (Davies *et al.* 2005, Anthony *et al.* 2007). As citocinas que foram avaliadas nesse estudo e que podem estar envolvidas na ativação de eosinófilos, IL-5, IL-10 e IL-13, não apresentaram níveis elevadas em indivíduos infectados, apenas CCL11 apresentou maiores concentrações, sendo um importante quimioatraente de eosinófilos. Apenas no grupo de indivíduos com carga parasitária média ou alta houve uma correlação positiva entre eosinófilos no sangue periférico e contagem de ovos por grama de fezes, corroborando resultados de outros autores (Sturrock *et al.*, 1983; Pereira *et al.*, 2010) e indicando o estado imunológico pouco definido em indivíduos com carga reduzida. A importância dos eosinófilos durante a infecção humana já foi provada. Em áreas endêmicas, indivíduos com elevados níveis de eosinófilos e anticorpos IgE específicos contra *S. mansoni*, apresentaram um menor risco de reinfecção (De Andres *et al.*, 1997).

Três meses após tratamento foram feitos novos exames parasitológicos e os participantes do estudo tornaram-se ovo-negativos, sem reinfecções. Em indivíduos com carga parasitária reduzida, o praziquantel normalmente tem uma alta eficácia e as taxas de cura são maiores que 90% (Abou-Shady *et al.*, 2016).

O praziquantel provoca uma polarização na resposta imune, com mudanças no perfil de citocinas e quimiocinas, devido a liberação de uma grande quantidade de antígenos (Bourke *et al.*, 2013). Na infecção natural, os ovos de *S. mansoni* são produzidos continuamente, alguns ficam retidos nos tecidos e depois de algumas semanas morrem. Em disparidades, estimativas e cálculos quanto ao tempo de vida estimado dos vermes indicaram um período de 5.7 a 10.5 anos (Fulford *et al.*, 1995), portanto a população cronicamente infectada é constantemente exposta a antígenos de ovos e esporadicamente expostos aos antígenos dos vermes adultos. Com o passar dos anos, a resposta imunológica se torna eficiente, com atenuação da doença e estabilidade da carga parasitária, impedindo uma hiperinfecção (Bourke *et al.*, 2013). Diferentemente dessa proteção que se desenvolve lentamente, o tratamento com praziquantel provoca a desintegração e a morte do verme, com destruição do mesmo, e liberação de antígenos em grande quantidade, estimulando o sistema imune e provocando em alguns casos reações intensas e resposta imunológicas efetivas e rápidas (Caldas *et al.*, 2000; Fitzsimmons *et al.*, 2012).

O grupo 4 a 99 opg, no presente trabalho, apresentou um aumento de IL-10. Wilson *et al.* (2011), relatou que durante o tratamento, pode ocorrer o aumento das concentrações de IL-10, sendo determinante para o desenvolvimento de mecanismos de proteção imunológica. As respostas de citocinas são alteradas no tratamento, com o aumento de citocinas e quimiocinas associadas a estimulação de eosinófilos como IL-5 e CCL11, esse aumento pode ocorrer

devido ao próprio tratamento ou há possíveis reinfecções (Colley & Secor, 2014). Esta relação entre a exposição aos antígenos e a vários tratamentos, resultam na maior produção de citocinas como IL-5, IL-13 e CCL11, como foi observado no presente trabalho em alguns indivíduos dos grupos < 4 opg, > 4 a 99 opg e \geq 100 opg, Três meses pós-tratamento.

O grupo < 4 opg, depois do tratamento, apresentou marcadores tipo 1 e Th17, (IL-1 β , CXCL10, TNF- α , IL-27 e IL-17) com poucas mudanças nas concentrações séricas. A citocina regulatória IL-10, aumentou no grupo com carga parasitária extremamente baixa, desta maneira, houve um mecanismo eficaz no controle da progressão da fibrose (Kitani *et al.*, 2003; Hesse *et al.*, 2004). A quimiocina CCL11 aumentou nesse grupo, podendo ser devido a reinfecções ou ao próprio tratamento. Com isso, esses dados nos mostram que é a população foco desse estudo é totalmente distinta, pois possui uma carga parasitária extremamente baixa e a modulação da resposta imunológica não é tão explícita como nos demais grupos (Silveira, 2011). Gazinelli *et al.* (1985) demonstra que indivíduos na fase aguda apresentam mais capacidade de expressar a resposta imunológica *in vitro* e *in vivo* do que indivíduos que estão na fase crônica da doença, principalmente na resposta do sangue periférico. Deve-se notar que a predominância de respostas anti-inflamatória depois do tratamento, pode ser devido ao processo de escolha da população, com a predominância dos indivíduos cronicamente infectados e com intensidade da infecção baixa (Wilson *et al.*, 2014).

A preocupação do presente estudo é a quantidade de indivíduos no grupo \geq 100 opg, sendo de 11 indivíduos apresentando essa intensidade de infecção, caracterizada como média a alta. Entretanto, a problemática é que os 11 indivíduos não sejam suficientes para uma boa estatística e não relate o verdadeiro perfil de citocinas e quimiocinas dessa população.

A coinfeção com helmintos e/ou protozoários nessa população pode dificultar ou mascarar o perfil de citocinas e quimiocinas específicas para a esquistossomose (Brasil, 2016).

Por fim, vários trabalhos são analisados com células estimuladas, enquanto o presente trabalho foi analisado com soro sistêmico (sangue periférico). As citocinas possuem uma meia vida curta, sendo produzida localmente e consumidas rapidamente. Portanto, usar soros da população pode dificultar a sua mensuração.

7. CONCLUSÃO

- No grupo de indivíduos com carga parasitária extremamente baixa, as maiores prevalências resultaram na primeira década de vida e nas faixas etárias mais velhas, contrapondo o perfil dos indivíduos com carga parasitária maior.

- Indivíduos com carga extremamente baixa apresentaram concentrações elevadas do marcador IL-6 no sangue periférico, mostrando que nesse grupo está ocorrendo um processo ativo inflamatório. Esse processo pode ocorrer devido à reinfecções, a coinfeções com helmintos e protozoários ou por falta de mecanismos de imunomodulação em caso de baixa carga parasitária.

- Três meses após tratamento, foi observado um aumento da quimiocina CCL11 no sangue periférico em indivíduos com carga extremamente baixa, provavelmente um reflexo ao tratamento e liberação de antígeno do parasita. Em geral, indivíduos infectados apresentaram uma tendência de diminuição de marcadores de inflamação e do tipo 1 e um aumento de marcadores do tipo 2, que poderiam ser benéficos em caso de reinfecção.

Esses dados nos mostram que indivíduos com carga parasitária baixa é uma população distinta, que se diferencia por poucos marcadores imunológicos no sangue periférico dos indivíduos não infectados, pois a sua resposta imunológica não é tão explícita como ocorre em indivíduos com carga média ou alta.

REFERÊNCIAS

- Abath F.G.C, Morais C.N.L, Montenegro C.E.L, Wynn T.A, Montenegro S.M.L (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology* 22: 85-91.
- Abau- Shady O.M, Mohammed S.S, Attia S.S, Yusuf H. A, Helmy D.O (2016). Therapeutic effect of mefloquine on *Schistosoma mansoni* in experimental infection in mice. *J. Parasit Dis.*;40 (2)259-67.
- Andrade, Z.A. (1987). "Pathogenesis of pipe-stem fibrosis of the liver (experimental observation on murine Schistosomiasis)." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82(3): 325-334.
- Andrade, Z.A. (2008). "Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression." *Acta Tropica* 108(2): 79-82.
- Anthony R.M, Rutitzky L.I, Urban J.F J.R, Stadecker M. J, Gause W.C. (2007). "Protective immune mechanisms in helminth infection." *Nature Immunology* 7(12): 975-987.
- Attallah, A. M., Ghanem G. E, Ismail H, El Waseef A.M (2003). "Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 68(6): 647-651.
- Bacellar O, Lessa H, Shriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra W.O, Gollob K.J, Carvalho E.M (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." *Infection and immunity* 70(12): 6734-6740.
- Barbosa, C. S. (2001). "An outbreak of acute schistosomiasis at Porto de Galinhas beach, Pernambuco, Brazil." *Cadernos de Saúde Pública* 17(3): 725-728.
- Batten M, Kljavin N.M, Li J, Walter M.J, Sauvage F.J, Ghilard N. (2008). "Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells." *The Journal of Immunology* 180(5): 2752-2756.
- Bethony, J., J. T. Williams, et al. (2001). "Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. II: household risk factors." *Tropical Medicine & International Health* 6(2): 136-145.
- Black, C. L., P. N. Mwinzi, et al. (2010). "Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human Schistosomiasis mansoni." *PLoS Negl Trop Dis* 4(3): e637.
- Bonnard, P., F. Remoue, et al. (2004). "Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology?" *The American journal of tropical medicine and hygiene* 71(2): 202-205.
- Bourke CD, Nausch N, Rujeni N, Appleby LJ, Mitchell KM, Midzi N, Mduluza T, Mutapi F. (2013). "Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies

changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis." *Journal of Infectious Diseases* **208**(1): 159-169.

Brasil, F. N. d. S. (2002). *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasília, Ministério da Saúde.

Brasil, M. d. S. S. (2016). "Sinan-Sistema de Informação de Agravos de Notificação." Retrieved 30 de agosto de 2016, 2016, from <HTTP://TABNET.DATASUS.GOV.BR/CGI/TABCGLEXESINANNET/CNV/LTAMG.DEF>

Brasil, M. d. S., Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis (2012). Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geo-helminthiases: plano de ação 2011-2015, *Ministério da Saúde Brasília*.

Brasil, M. d. s., Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de vigilância epidemiológica (2014). Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas/ministério da saúde, secretaria de vigilância em saúde, departamento de vigilância das doenças transmissíveis. Brasília, *Ministério da Saúde*.

Bustinduy AL, Parraga IM, Thomas CL, et al. (2013). Impact of polyparasitic infections on anemia and undernutrition among Kenyan children living in a *Schistosoma haematobium*-endemic area. *Am J Trop Med Hyg*; 88: 433-40.

Caldas I.R, Azevedo A.C.C, Oliveira L.F.A, Silveira A.M.S, Oliveira R.C, Gazzinelli G (2008). "Human *Schistosomiasis mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection." *Acta tropica* **108**(2): 109-117.

Caldas I. R, Correa-oliveira R, Colosimo E, Carvalho O. S, Massara C. L, Colley D. G and Gazzinelli G (2000). "Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **62**(1): 57-64.

Caldeira K, Teixeira C. F, Silveira M. B, Fries L.C.C, Romanzini J, Bittencourt H.R, Graeff-Teixeira C (2012). "Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Parana, southern Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**(5): 690-692.

Cavalcanti M.G, Silva L.F, Peralta R.H.S, Barreto M.G.M, Peralta J.M (2013). "Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis." *Trends in parasitology* **29**(2): 75-82.

Chitsulo, L, Engels D, Montresor A, Savioli L.(2000). "The global status of schistosomiasis and its control." *Acta tropica* **77**(1): 41-51.

Coelho P. M .Z, Jurberg A. D, Oliveira Á. A , Katz N (2009). "Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**(5): 720-723.

Colley, D. and W. Secor (2014). "Immunology of human schistosomiasis." *Parasite immunology* **36**(8): 347-357.

Colley, D. G., A. L. Bustinduy, et al. (2014). "Human schistosomiasis." *The Lancet* **383**(9936): 2253-2264.

Coutinho, H. M., T. Leenstra, et al. (2006). "Pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein are associated with undernutrition in the context of *Schistosoma japonicum* infection." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **75**(4): 720-726.

Coutinho-Azevedo R.B, Pimentel M.I, Zanini G.M, Madeira M.F, Cataldo J.I, Schubach A.O, Quintella L.P, Mello C.X, Mendonça S.C.F. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesion and poor response to therapy in American tegumentary Leishmaniases. *Acta tropica* 2015 154: 42-49.

Couto F.F.B, Coelho P.M.Z, Araújo N, Katz N, Mattos A.C .A. (2010). "Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel." *Parasitology* **137**(12): 1791-1797.

Czaja, M. J., Weiner F. R, Takahashi S, Giambrone M.A, Van Der Meide P.H, Schellekem H, Biempical L, Zern M. A (1989). "γ-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis." *Hepatology* **10**(5): 795-800.

Da Frota S. M, Carneiro T. R, Queiroz J. A, Alencar L. M, Heukelbach J, Bezerra, F. S.(2011). "Combination of Kato–Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil." *Acta tropica* **120**: S138-S141.

Davies S.J, Smith S.J, Lim K.C, Zhang H, Purchio A.F, McKerrow J.H, West D.B. (2005). "In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs." *International journal for parasitology* **35**(8): 851-859.

De Andres B, Rakasz E, Hagen M, McCormik M.L, Mueller A.L, Elliot D, Metwali A, Sandor M, Britigan B.E, Weinstock J.V, Lynch R.G. (1997). "Lack of Fc-ε receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections." *Blood* **89**(10): 3826-3836.

De Stigter KV, King CH, Keating CE, Ouma JH, Siongok TK, Mahmoud AA(1989). Effect of targeted mass treatment on intensity of infection and morbidity in schistosomiasis mansoni: seven-year follow-up of a community in Machakos, Kenya. *Trans Assoc Am Physicians* **102**: 209–12.

De Vlas, S. and B. Gryseels (1992). "Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences." *Parasitology Today* **8**(8): 274-277.

Domingues, A., L. Domingues, et al. (1994). "Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica." *Esquistossomose mansônica. Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife*: 91-109.

Dos Santos Carvalho, O., P. M. Z. Coelho, et al. (2008). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar, SciELO-Editora FIOCRUZ*.

Drummond SC, Silva LCS, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci JR. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006; Vol. 101(Suppl. I): 37-44.

- Dunne, D. W. and A. Cooke (2005). "A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease." *Nature Immunology* **5**(5): 420-426.
- Dustin, M. L., R. Rothlein (1986). "Induction by IL-1 β and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)." *The Journal of Immunology* **137**(1): 245-254.
- Enk, M. J, Lima A.C.L, Drummond S.C, Schall V.T, Coelho P. M. Z. (2008). "The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission." *Acta tropica* **108**(2): 222-228.
- Figueiredo- Sousa J. C, Betson M, Kabatereine N. B, Stothard J. R.(2013) .The Urine Circulating Cathodic Antigen (CCA) Dipstick: A Valid Substitute for Microscopy for Mapping and Point-Of-Care Diagnosis of Intestinal *Schistosomiasis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. January.
- Finkelman F.D, Pearce E.J, Urban Jr. J.F, Sher A. Regulation and biological function of helminth- induced cytokine responses (1991). *Elsevier Science Publishers* 0167- 49.
- Fitzsimmons, C. M., F. M. Jones, (2012). "Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis?" *Infection and immunity* **80**(12): 4264-4270.
- Friedman, S. L. (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." *Physiological* **88**(1): 125-172.
- Fulford A.J, Butterworth A.E, Ouma J.H, Sturrock R.F.(1995). "A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man." *Parasitology* **110**(03): 307-316.
- Gazzinelli, G, Lambertucci J.R., Katz N, Rocha R.S, Lima M.S, Colley D.G. (1985). "Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment." *The Journal of Immunology* **135**(3): 2121-2127.
- Geiger S.M, Botelho A.J, Williams W, Alexander N, Diemert D. J, Bethony J. M. (2013). "Serum CCL11 (eotaxin-1) and CCL17 (TARC) are serological indicators of multiple helminth infections and are driven by *Schistosoma mansoni* infection in humans." *Tropical Medicine & International Health* **18**(6): 750-760.
- Grenfell R.F.Q, Martins W, Enk M, Almeida Á, Siqueira L, Silva-Moraes V, Oliveira E, Carneiro N. F. F, Coelho P. M. Z. (2013). "*Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**(3): 328-334.
- Gressner A.M, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. (2002). "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis." *Front Biosci* **7**(1): d793-807.

Gryseels, B. (2012). "Schistosomiasis." *Infectious Disease Clinics of North America* **26**(2): 383-397.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J & Kestens L. (2006). "Human schistosomiasis." *The Lancet* **368**(9541): 1106-1118.

Gu, C., L. Wu, et al. (2013). "IL-17 family: cytokines, receptors and signaling." **64**(2): 477-485.

Guimarães R.J.P.S, Freitas C.C, Dutra L.V , Scholte R.G.C , Amaral R. S, Drummond S, Shimabukuro Y. E, Oliveira G.C, Carvalho O.S.C. (2010). "Evaluation of a linear spectral mixture model and vegetation indices (NDVI and EVI) in a study of *Schistosomiasis mansoni* and *Biomphalaria glabrata* distribution in the state of Minas Gerais, Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**(4): 512-518.

Hayashi, M. (2003). "Clinical features of cerebral schistosomiasis, especially in cerebral and hepatosplenomegaly type." *Parasitology international* **52**(4): 375-383.

Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. (2007). "Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis—a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies." *Journal of hepatology* **46**(5): 955-975.

Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudard J (2002). "Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease." *The Journal of Immunology* **169**(2): 929-936.

Hesse, M., C. A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Pruefer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A. W. Cheever, E. M. Shevach, and T. A. Wynn. (2004). "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells." *The Journal of Immunology* **172**(5): 3157-3166.

Hewitson J.P, Grainger J.R, Maizels R.M. (2009). "Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity." *Molecular and Biochemical parasitology* **167**(1): 1-11.

Hoffmann W. A, Pons J. A, Janer J. L. (1934). "The Sedimentation-Concentration Method In *Schistosomiasis mansoni*." *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* **9**(3): 283-291.

IBGE. (2015). "Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística." Retrieved August, 30th, 2016.

Jones M.K, Bong S.H, Green K.M, Holmes P, Duke M (2008). "Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(11): e334.

Kato, K. and M. Miura (1954). "Comparative examinations." *Japanese Journal of Parasitology* **3**(5).

Katz, N. and O. d. S. Carvalho (1983). "Introdução recente da esquistossomose mansoni no sul do estado de Minas Gerais, Brasil." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **78**(3): 281-284.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A (1972). "A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **14**(6): 397-400.

King, C. H. (2001). "Epidemiology of schistosomiasis: determinants of transmission of infection." *Schistosomiasis. Imperial College Press, London, United Kingdom*: 115-132.

Kitani, A.I. Fuss, K.Nakamura, F. Kumaki, T. Usui, and W. Strober. (2003). "Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis." *The Journal of experimental medicine* **198**(8): 1179-1188.

Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annual review of immunology* **27**: 485-517.

Kovacs, E. J. (1991). "Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue." *Immunology today* **12**(1): 17-23.

Kufareva I, Salanga CL, Handel TM. (2015). "Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies." *Immunology and cell biology* **93**(4): 372-383.

Kure A, Mekonnen Z, Dana D, Bajiro M, Ayana M, Vercurysse J. and Levecke B (2015). "Comparison of individual and pooled stool samples for the assessment of intensity of *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminth infections using the Kato-Katz technique." *Parasites & vectors* **8**(1): 1.

Lambertucci, J. R. (2010). "Acute *Schistosomiasis mansoni*: revisited and reconsidered." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**(4): 422-435.

Lambertucci, J. R., J. C. Serufo, et al. (2000). "*Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control." *Acta tropica* **77**(1): 101-109.

Lee, S. D. and P. Tontonoz (2014). "Eosinophils in fat: pink is the new brown." *Cell* **157**(6): 1249-1250.

Legesse, M. and B. Erko (2007). "Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of *Schistosoma mansoni* by detecting circulating cathodic antigen in urine before and after chemotherapy." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **101**(7): 668-673.

Lutz, A. (1919). "*Schistosomum mansoni* and Schistosomatosis observed in Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **11**(1): 121-155.

Magalhães, M. N. and A. C. P. de Lima (2010). Noções de probabilidade e estatística, *IME-USP -São Paulo*:

Maizels, R. M, Bundy D.A.P, Selkirk M.E, Smith D.F, Roy M.A. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations (1993). *Nature*, 797-803.

Maizels, R. M. and M. Yazdanbakhsh (2003). "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms." *Nature Immunology* **3**(9): 733-744.

Marra, F. and F. Tacke (2014). "Roles for chemokines in liver disease." *Gastroenterology* **147**(3): 577-594. e571.

Martins-Filho O.A, Dutra W.O, Freeman G.L, Silveira A.M, Rabello A, Colley D.G, Prata A , Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra J. (1999). "Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules." *Digestive diseases and sciences* **44**(3): 570-577.

Matoso L. F, Oliveira-Prado R, Abreu M. N. S, Fujiwara R.T, LoVerde P. T, Kloos Helmut, Gazzinelli A, Correa-Oliveira R.(2013). "Longitudinal analysis of antigen specific response in individuals with *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Minas Gerais, Brazil." *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **107**(12): 797-805.

Mbow M, Larkin B.M, Meurs L, Wammes L.J, de Jong S.E, Labuda L.A, Camara M, Smits H.H, Polman K, Dieye T.N (2013). "T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis." *Journal of Infectious Diseases* **207**(1): 186-195.

Ministério da Saúde, S. d. V. e. S., Departamento de Vigilância Epidemiológica (2010). Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da esquistossomose (PCE). Brasília, *Ministério da Saúde*.

Moore, D. L., D. I. Grove, et al. (1977). "The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations." *The Journal of pathology* **121**(1): 41-50.

Morgan, J. A, Dejong, R. J, Snyder, S. D, Mkoji, G. M. e Loker, E. S. (2001). "*Schistosoma mansoni* and Biomphalaria: past history and future trends." *Parasitology* **123**(07): 211-228.

Negrão- Corrêa D, Fittipaldi J.L, Lambertucci J.R, Teixeira M.M, Antunes C.M.F, Carneiro M. (2014). "Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil." *PloS one* **9**(2): e88042.

Nembrini C, Marsland B.J, Kopf M. (2009). "IL-17–producing T cells in lung immunity and inflammation." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**(5): 986-994.

Noya O, Katz N, Pointier J.P, Theron A, Noya B.A (2015). Schistosomiasis in America. *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*, Springer: 11-43.

Oliveira W.J. Análise e Comparação da sensibilidade e especificidade entre diferentes métodos de diagnóstico para *Schistosoma mansoni*: Gradiente salino, Helmintex®, Centrífugo-sedimentação, Kato-Katz e teste rápido urina (poc-cca). 2015.105f Dissertação (Mestrado)– UFMG – *Instituto de Ciências Biológicas, Minas Gerais*.

Oliveira R. R, Figueiredo J. P, Cardoso L. S, Jabar R. L, Souza R. P, Wells M. T, Carvalho E. M, Fitzgerald D. W, Barnes K. C, Araujo M. I, Glesby M. J. (2012). "Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **86**(2): 296-305.

- Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." *Nat Rev Immunol* **2**(7): 499-511.
- Pearce, E. J. and A. Sher (1991). "Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*." *Experimental parasitology* **73**(1): 110-116.
- Pereira W.R, Kloosb H, Crawfordc S.B, Velásquez –melendez J.G, Matoso L.F, Fujiwara R.T, Cançado G.G.L, Loverde F.T, Correa-Oliveiraa R, Gazzinelli A. (2010). "*Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk." *Acta tropica* **113**(1): 34-41.
- Prata, A. (1997). Esquistossomose mansônica. *Tratado de infectologia*. R. F. Veronei, R. São Paulo, Atheneu.
- Prata, A. (2001). Disease in *schistosomiasis mansoni* in Brazil. Schistosomiasis. A. Mahmoud. London, *Imperial College Press*: 297-332.
- Rabello, A. (1997). "Diagnosing schistosomiasis." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**: 669-676.
- Ross A.G, Bartley P.B, Sleight A.C (2002). "Schistosomiasis." *New England Journal of Medicine* **346**(16): 1212-1220.
- Rückerl, D. and J. E. Allen (2014). "Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection." *Immunological* **262**(1): 113-133.
- Saha B., Prasanna YS., Chandrasekar B & Nandi D(2010). "Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon γ ." *Cytokine* **50**(1): 1-14.
- Schwartz, C., Oeser K., Prazeres da Costa C, Layland L.E,Voehringer D (2014). "T Cell-Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils." *The Journal of Immunology* **193**(7): 3590-3599.
- Silveira, A. C. d. O. (2011). "Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase aguda da esquistossomose mansônica humana.". Dissertação de mestrado. Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte - MG. 141pp.
- Silveira A.M.S, Gazzinelli G, Oliveira L.F, Bethony J, Gazzinelli A, Queiroz C.C, Alvarez M.C.B, Silva F.C, Prata A, Loverde P.T, Oliveira R.C. (2004). "Human *Schistosomiasis mansoni*: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon- γ and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**(9): 514-519.
- Siqueira-Batista R. Medeiros LB & Ramos Júnior AN.(1998). "O *Schistosoma mansoni*, Esquistossomose Mansonii. São Paulo, *Grupo Editorial Moreira Jr.*
- Sousa-Figueiredo, J. C., M. Betson, et al. (2013). "The urine circulating cathodic antigen (CCA) dipstick: a valid substitute for microscopy for mapping and point-of-care diagnosis of intestinal schistosomiasis." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(1): e2008.

Souza A.L, Roflê E, Pinho V, Sousa D.G, Silva A.F.(2005). "Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 α in human and experimental schistosomiasis." *Infection and Immunity* **73**(4): 2515-2523.

Souza P.C, Vitorino R.R, Costa A.P, Farina F.C.J, Santana L.A, Gomes A.P. (2011). "Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural." *Rev Bras Clin Med São Paulo* **9**(4): 300-307.

Spear R.C, Seto E.Y, Carlton E.J, Liang S., Remais J.V, Zhong B, Qiu D. (2011). "The Challenge of effective surveillance in moving from low transmission to elimination of schistosomiasis in China." *International journal for parasitology* **41**(12): 1243-1247.

Stadecker E.T, Asahi H, Finger E, Hernandez H.J, Rutitzky L, Sun J.(2004). "The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis." *Immunological* **201**(1): 168-179.

Stothard JR, Sousa-Figueiredo JC, Betson M, et al. (2011). Closing the praziquantel treatment gap: new steps in epidemiological monitoring and control of schistosomiasis in African infants and preschool-aged children. *Parasitology* **138**: 1593–606.

Sturrock R.F, Kimani R, Cottrell B.J, Butterworth A.E, Seitz H.M, Siongok T.K, Houba V.(1983). "Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *Schistosoma mansoni*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **77**(3): 363-371.

Taylor, J. J, Mohrs M. e Pearce E. J. (2006). "Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Populatio." *The Journal of Immunology* **176**(10): 5839-5847.

Teixeira C. F, Neuhauss E, BEM R, RomanzinI J, Graeff-Teixeira C.(2007). "Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field." *PLoS Negl Trop Dis* **1**(2): e73.

Utzinger J, N’Goran E.K, Caffrey C.R, Keiser J (2011). "From innovation to application: social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis." *Acta tropica* **120**: S121-S137.

Van D. W, De Vlas S. J, Brooker S, Looman, C.W, Nagelkerke N. J, Habbema, J. D, Engels D. (2003). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, Netherlands, v. 86, n. 2-3, p. 125- 139.

Van Dam, G.J, Wichers J.H, Falco Ferreira T.M, Ghatai, D, Van Amerongen A, Deelder A.M. (2004). "Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen." *Journal of clinical microbiology* **42**(12): 5458-5461.

Van Den Biggelaar AH, Borrmann S, Kreamsner P, Yazdanbakhsh M. (2002). Immune responses induced by repeated treatment do not result in protective immunity to *Schistosoma haematobium*: interleukin (IL)-5 and IL-10 responses. *J Infect Dis*; **186**:1474–82.

Vella, A. T. and E. Pearce (1992). "CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage." *The Journal of Immunology* **148**(7): 2283-2290.

Walter K, Fulford AJ, McBeath R (2006). "Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens." *The Journal of Immunology* **177**(8): 5490-5498.

Wasmuth H.E, Tacke F, Trautwein C.(2010). Chemokines in liver inflammation and fibrosis. Seminars in liver disease, © *Thieme Medical Publishers*.

Webster M, Roberts M, Fulford AJ et al.(1998). "Human IgE responses to rSm22. 6 are associated with infection intensity rather than age per se, in a recently established focus of *Schistosomiasis mansoni*." *Tropical Medicine & International Health* **3**(4): 318-326.

Weerakoon K.G.A.D, Gobert G. N, Cai P, McManus D. P (2015). "Advances in the diagnosis of human schistosomiasis." *Clinical microbiology reviews* **28**(4): 939-967.

WHO (2002). Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee, *World Health Organization*.

WHO (2008). "Elimination of schistosomiasis from low transmission areas." *Report of a WHO Informal Consultation, Salvador, Bahia, Brazil*: 18-19.

WHO (2009). "Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, 18-19 August 2008."

World Health Organization. Schistosomiasis : Progress report 2001 -2011 and strategic plan 2012 - 2020. *Genova*, 2012.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. (2007) Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*85: 148-154.

Wilson M.S, Cheever A.W, White S.D, Thompson R.W & Wynn TA .(2011). "IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*." *PLoS Pathog* **7**(8): e1002171.

Wilson S, Jones FM, Kenty LC, Mwatha JK, Kimani G, Kariuki HC, Dunne DW. J. (2014). "Posttreatment changes in cytokines induced by *Schistosoma mansoni* egg and worm antigens: dissociation of immunity-and morbidity-associated type 2 responses." *Journal of Infectious Diseases* **209**(11): 1792-1800.

Wu H, Wang kun, Li, G, Meng D, Han J, Wang Guonian and Li Y. (2016). "Effects of transcutaneous acupoint electrical stimulation on the imbalance of Th1, Th2, Th17 and Treg cells following thoracotomy of patients with lung cancer." *Experimental and therapeutic medicine* **11**(2): 495-502.

Wynn, T. A., R. Morawetz, et al. (1997). "Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1-and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo." *The Journal of Immunology* **159**(10): 5014-5023.

Wynn, T. A., R. W. Thompson, et al. (2004). "Immunopathogenesis of schistosomiasis." *Immunological* **201**(1): 156-167.

Zaccone P, Burton O, Miller N (2009). "*Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice." *European journal of immunology* **39**(4): 1098-1107.

Zhang, Y., L. Chen, et al. (2012). "IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice." *European journal of immunology* **42**(6): 1523-1535.

Zimmermann, N. and M. E. Rothenberg (2003). "Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils." *Journal of allergy and clinical immunology* **111**(1): 97-105.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* **36**(5): 705-716.

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Participantes menores de 7 anos Convite para participar

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é _____ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado nos Municípios de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiaçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas

amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

Riscos e Benefícios

Os benefícios provenientes da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para o seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade que porventura participe da pesquisa são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

Confidencialidade:

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade serão guardados apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

Informações adicionais

Você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade também podem e devem fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos.

Você e seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade têm a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico do seu filho ou menor sob sua responsabilidade. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Consentimento e Assentimento:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: _____

Assinatura do Responsável: _____

Assinatura do Entrevistador: _____

Impressão Digital (opcional)

Data: ____ de _____ de 20__ .

ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: stefan.geiger76@gmail.com

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: martinenk@iec.pa.gov.br

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Participantes menores de 18 anos
Convite para participar

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é _____ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leiam e/ou ouçam atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento ou assentimento.

Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado nos Municípios de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiaçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas

amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

Riscos e Benefícios

Os benefícios provenientes da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para o seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade que porventura participe da pesquisa são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

Confidencialidade:

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade serão guardados apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

Informações adicionais

Você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade também podem e devem fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos.

Você e seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade têm a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico do seu filho ou menor sob sua responsabilidade. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Consentimento e Assentimento:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: _____

Assinatura do Responsável: _____

Assinatura do Entrevistador: _____

<p>Impressão Digital (opcional)</p>
--

Data: ____ de _____ de 20__ .

ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: stefan.geiger76@gmail.com

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: martinenk@iec.pa.gov.br

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Participantes maiores de 18 anos
Convite para participar

Você, _____ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado no Município de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS N° 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos da xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

Riscos e Benefícios

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para você é mínimo. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

Confidencialidade:

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e sua será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

Informações adicionais

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Consentimento:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: _____

Assinatura do Responsável: _____

Assinatura do Entrevistador: _____

Impressão Digital (opcional)

Data: ____ de _____ de 20__ .

ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: stefan.geiger76@gmail.com

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: martinenk@iec.pa.gov.br

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Novas técnicas de diagnóstico para Schistosoma mansoni e geohelmintos.

Pesquisador: Paulo Marcos Zech Coelho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21824513.9.0000.5091

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.888

Data da Relatoria: 27/01/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto: Schistosoma mansoni e geohelmintos, Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos, coordenado por Dr. Paulo Marcos Zech Coelho do CPqRR e equipe de pesquisadores de outras quatro instituições. Recursos do DCIT totalizando R\$650.000,00

Objetivo da Pesquisa:

Meta: Realizar estudos parasitológicos, epidemiológicos e imunológicos em áreas de média a baixa endemicidade para a esquistossomose mansoni, visando obter uma visão real e atual dos aspectos de transmissão e morbidade associados à infecção por Schistosoma mansoni e geohelmintos que permita a proposição de estratégias de controle e tratamento compatível com realidade da doença e com a atuação do sistema de saúde.

Objetivos específicos:

1. Levantamento da prevalência da infecção por S. mansoni e geohelmintos em áreas da Amazônia, baixada Maranhense e Norte de Minas Gerais, onde as características de transmissão da infecção humana por helmintos são bastante diferenciadas.
2. Comparação da sensibilidade do método de Kato-Katz com os novos testes diagnósticos (Helmintex, gradiente, CCA modificado e PCR) para monitoramento da transmissão e cura após

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 518.888

tratamento.

3. Tratamento dos indivíduos infectados e monitoramento da eficácia do controle quimioterápico de helmintoses na transmissão e na morbidade (reversão do quadro clínico)
4. Levantamento malacológico e monitoramento de taxas de infecção natural de *Biomphalaria* antes e após interferência
5. Padronização de metodologia molecular baseada no LAMP para detecção da infecção por *S. mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*.
6. Avaliação de marcadores de morbidade (imagem e imunológicos) da esquistossomose mansoni, antes do primeiro tratamento e durante o seguimento.
7. Analisar o possível efeito de co-morbidades (co-infecção por geohelminhos, status nutricional e doenças inflamatórias crônicas) na morbidade de esquistossomose mansoni.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos envolvidos nesse projeto referem-se à venipuntura. Os voluntários serão informados dos possíveis riscos e terão atendimento médico especializado garantido. Venipuntura - A venipuntura é um procedimento muito seguro e realizado de rotina em qualquer centro de saúde de atenção básica. Alguns eventos adversos relacionados com a venipuntura podem ser: hematomas no local da introdução da agulha, uma complicação atinge cerca de 3% das pessoas submetidas a tal procedimento, e que resolve em até duas semanas; tonteira ou desmaio, devido a reação vasovagal, que atinge cerca de 1% das pessoas submetidas à venipuntura; síncope, que ocorre 1 vez a cada 10.000 procedimentos; e punção arterial que é um evento raríssimo (1:50.000).

Benefícios:

Todos os participantes do estudo ou seus responsáveis legais serão devidamente informados do estudo e solicitados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta de dados. Os voluntários serão informados que não obterão benefícios diretos pela participação no projeto. Entretanto, todos os voluntários receberão atenção médica personalizada oferecida pelo projeto sem ônus para o participante, incluindo exames laboratoriais de rotina. Todos os indivíduos com infecção por *S. mansoni* ou geohelminhos confirmadas serão encaminhados para o serviço de saúde para tratamento específico, indivíduos com outras doenças que possam ser identificadas também serão encaminhados para tratamento especializado.

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 518.888

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem fundamentada do ponto de vista científico, com objetivos relevantes. A coordenação e a equipe têm qualificação e experiência importantes, assim como as competências das instituições participantes e o orçamento aprovado, são garantias suficientes de que a pesquisa será conduzida como planejada e levada à termo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as recomendações sugeridas no parecer emitido em outubro/2013 foram adequadamente atendidas. Não há novas inadequações e pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colocado em discussão o parecer do relator, o Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, decidiu pela Aprovação deste projeto.

BELO HORIZONTE, 31 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Naftale Katz
(Coordenador)

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br