

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES**

Tamires da Silva Montanhas

**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *SCHISTOSOMA*
MANSONI RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA**

Governador Valadares – MG

2019

Tamires da Silva Montanhas

**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *SCHISTOSOMA*
MANSONI RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Farmácia
da Universidade Federal de Juiz de Fora –
UFJF, *campus* Governador Valadares, como
requisito parcial para conclusão do curso de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora

Dr(a). Pauline Martins Leite Borges

Governador Valadares – MG

2019

COLABORADORES:**Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares**

Dr^a Alda Maria Soares Silveira

Dr^a Lucia Alves de Oliveira Fraga

Dr^o Girley Francisco Machado de Assis

Letícia Martucci

Jennifer Delgado Garcia

Daniel Madeira Cardoso

Eduardo Chang

Larissa Moura de Matos Franco

Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE

Msc. Thalisson Artur Ribeiro Gomides

Marlucy Rodrigues Lima

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Dra. Amanda Braga de Figueiredo

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR / FIOCRUZ

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Montanhas, Tamires da Silva.

Perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em área endêmica / Tamires da Silva Montanhas. -- 2019.

93 p.

Orientadora: Pauline Martins Leite Borges

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2019.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Citocinas. 3. SmATPDases. 4. Carga parasitária. 5. Ecogenicidade periportal. I. Borges, Pauline Martins Leite, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e aos meus amigos que estiveram comigo durante toda a caminhada para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelas oportunidades que me foram dadas, pelo o seu infinito amor, cuidado e força que me permitiram chegar até aqui.

À **Professora Doutora Pauline Martins Leite Borges** que me permitiu conhecer o universo encantador da pesquisa científica, aceitou compartilhar comigo seus conhecimentos e me forneceu todo o suporte necessário para a realização desse trabalho. Obrigada, por ter me acolhido como orientanda e por ter cumprido o papel de orientadora com tamanho amor, zelo e comprometimento. Você se tornou um referencial de profissional e de ser humano para mim.

A minha mãe **Luciana Ferreira** que foi o meu ponto de apoio, sonhou junto comigo e enfrentou todas as dificuldades para me ver realizando este sonho.

Aos meus avós **Jandir e Emília** (*in memoriam*) que sempre me incentivaram a não desistir e a correr atrás das realizações dos meus sonhos.

Ao **Daniel Madeira** que tornou os dias de minha jornada acadêmica mais leve, alegre e divertida. Meus sinceros agradecimentos por todo apoio e incentivo.

Aos meus queridos amigos, obrigada pelo carinho, confiança, incentivo e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos colaboradores que foram peças fundamentais para a realização desse trabalho.

A todas as pessoas que me auxiliaram durante a minha trajetória estudantil e torceram positivamente por mim. Meus sinceros agradecimentos!

“O insucesso é apenas uma oportunidade
para recomeçar com mais inteligência.”

Henry Ford

RESUMO

A esquistossomíase mansônica é uma doença causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, está associada ao clima tropical e a veiculação hídrica, possuindo alto índice de incidência em países emergentes como o Brasil. A infecção leva ao desenvolvimento de várias manifestações clínicas e a severidade da doença é consequência da fibrose causada pela reação granulomatosa ao redor dos ovos depositados no sistema porta hepático. Fatores ou mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dessas manifestações clínicas e da morbidade ainda não são totalmente conhecidos, no entanto, sabe-se que a resposta imune exerce um papel importante. Diante disso, o presente estudo buscou avaliar o perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* residentes em área endêmica e analisar a influência de variáveis como idade, sexo, carga parasitária, alterações na ecogenicidade periportal e expressão de SmATPDases na resposta imunológica desses indivíduos. O estudo envolveu 64 indivíduos infectados e 33 não infectados, sendo 19 residentes e 14 não residentes em área endêmica para a doença. Todos os participantes preencheram o questionário sociodemográfico; realizaram o exame parasitológico de fezes, exame clínico e ultrassonografia abdominal; e participaram da coleta de sangue. Os ovos do parasita foram obtidos por tamisação de amostras fecais para a determinação da expressão das SmATPDases por qPCR e as PBMCs foram obtidas do sangue periférico para a estimulação *in vitro* com SEA e coleta do sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas. Os níveis de citocinas foram medidos por citometria de fluxo e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Prism 5.0. O estudo demonstrou que os indivíduos infectados com *S. mansoni* produziram maiores níveis de IL-4, IL-10 e menores de IL-2 em relação aos indivíduos não infectados. A idade, carga parasitária, expressão de SmATPDase 2 e alteração na ecogenicidade periportal mostraram-se como fatores relevantes na resposta imune de indivíduos infectados. Indivíduos infectados que possuíam entre 0 a 19 anos apresentaram maiores níveis de IL-4 quando comparados aos de 20 a 59 anos. Indivíduos infectados que apresentaram alta carga parasitária (> 100 opg) produziram maiores níveis de IL-10 quando comparado aos indivíduos que possuíam baixa carga parasitária (< 50 opg). Além disso, os indivíduos com carga parasitária extremamente alta (> 300 opg) apresentaram maiores níveis de TNF e IL-10 em comparação com os indivíduos com carga parasitária extremamente baixa (< 5 opg). Em relação a expressão das enzimas, os indivíduos infectados que expressaram apenas a enzima SmATPDase 2 em suas amostras de fezes produziram maiores níveis de IL-6 quando comparado aos indivíduos que expressaram ambas as enzimas (SmATPDase 1 e 2). A hiperecogenicidade também se apresentou como um fator interferente na resposta imunológica,

uma vez que indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal produziram maiores níveis de IL-10 e TNF e, menores níveis de IL-17. Em conjunto, esses resultados sugerem que a resposta imune de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* pode contribuir para a morbidade da doença, uma vez que o aumento da carga parasitária e alterações na ecogenicidade periportal estão associadas a um aumento dos níveis de IL-10 e TNF, citocinas associadas ao desenvolvimento de fibrose. Além disso, é importante observar que fatores associados ao indivíduo, como a idade, bem como fatores relacionados ao parasito, como a expressão de ectonucleotidases, podem alterar a resposta imunológica do indivíduo durante a infecção.

Palavras chaves: *Schistosoma mansoni*, Citocinas, SmATPDases, carga parasitária, ecogenicidade periportal

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni*, is associated with tropical climate and waterborne, and has a high incidence rate in emerging countries such as Brazil. The infection leads to the development of several clinical manifestations and the severity of the disease is a consequence of the fibrosis caused by the granulomatous reaction around the eggs deposited in the hepatic portal system. Factors or mechanisms responsible for the development of these clinical manifestations and morbidity are not yet fully understood, however, it is known that the immune response plays an important role. The present study aimed to evaluate the cytokine profile of *S. mansoni* infected individuals residing in the endemic area and to analyze the influence of variables such as age, sex, parasitic load, changes in periportal echogenicity and expression of SmATPDases in the immunological response of these individuals. The study involved 64 infected and 33 uninfected individuals, with 19 residents and 14 not residing in an area endemic to the disease. All participants completed the sociodemographic questionnaire; performed the parasitological examination of feces, clinical examination and abdominal ultrasonography; and participated in the collection of blood. The parasite eggs were obtained for the determination of SmATPDases expression by qPCR. Cytokine levels were measured by flow cytometry and statistical analyzes were performed using Prism 5.0. The study demonstrated that individuals infected with *S. mansoni* produced higher IL-4, IL-10 and lower levels of IL-2 than uninfected individuals. Age, parasite load, SmATPDase 2 expression and hyperechogenicity were shown to be relevant factors in the immune response of infected individuals. Infected individuals who were between 0 and 19 years old had higher IL-4 levels when compared to those aged 20 to 59 years. Infected individuals who had high parasite load (> 100 opg) produced higher levels of IL-10 when compared to individuals who had low parasitic load (<50 opg). In addition, individuals with extremely high parasite load (> 300 opg) had higher TNF and IL-10 levels compared to individuals with extremely low parasite load (<5 opg). Infected individuals who expressed only the SmATPDase 2 enzyme in their stool samples produced higher IL-6 levels when compared to the individuals expressing both enzymes (SmATPDase 1 and 2). Hyperechogenicity also presented as an interfering factor in the immune response, since individuals with altered periportal echogenicity produced higher levels of IL-10 and TNF and lower levels of IL-17. Taken together, these results suggest that the immune response of individuals infected with *Schistosoma mansoni* may contribute to disease morbidity, since increased parasitic load and changes in periportal

echogenicity are associated with increased levels of IL-10 and TNF, cytokines associated with the development of fibrosis. In addition, it is important to note that factors associated with the individual, such as age, as well as factors related to the parasite, such as the expression of ectonucleotidases, may alter the individual's immune response during infection.

Key words: *Schistosoma mansoni*, Cytokines, SmATPDases, parasitic load, periportal echogenicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	6
Figura 2 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 na população de indivíduos infectados por <i>S. mansoni</i>	37
Figura 3 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 na população de indivíduos não infectados por <i>S. mansoni</i> e residentes em área não endêmica.....	38
Figura 4 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-2 na população de indivíduos não infectados por <i>S. mansoni</i> residentes em área endêmica.	39
Figura 5 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-2 na população de indivíduos não infectados por <i>S. mansoni</i>	40
Figura 6 – Indivíduos infectados com <i>S. mansoni</i> produzem maiores níveis de IL-4, IL-10 e menores de IL-2.	42
Figura 7 – Avaliação da produção de citocinas em indivíduos do sexo masculino e feminino.	45
Figura 8 – Indivíduos infectados que possuem entre 0 a 19 anos apresentam maiores níveis de IL-4 quando comparados aos de 20 a 59 anos.	46
Figura 9 – Avaliação da imunosenescência no perfil de citocinas produzidas por PBMC obtidas de indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	48
Figura 10 – Os indivíduos infectados que apresentam alta carga parasitária (> 100 opg) produzem maiores níveis de IL- 10 quando comparado aos indivíduos que possuem baixa carga parasitária (< 50 opg).	51
Figura 11 – Os níveis de TNF e IL-10 são maiores em indivíduos que possuem carga parasitária extremamente alta.	52
Figura 12 – Os indivíduos infectados que expressaram apenas a enzima SmATPDase 2 em suas amostras de fezes produziram maiores níveis de IL-6 quando comparado aos indivíduos que expressaram ambas as enzimas (SmATPDase 1 e 2).	55
Figura 13 – Indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal produziram maiores níveis de IL-10 e TNF e, menores níveis de IL-17.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição geográfica da esquistossomose.	4
--	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados na qPCR.	23
Tabela 2 – Caracterização da população de estudo.	30
Tabela 3 – Caracterização dos indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal.	33
Tabela 4 – Expressão de SmATPDases em amostras fecais de indivíduos infectados com <i>S. mansoni</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno

ATP – Adenosina Trifosfato

CP – Carga parasitária

E-NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

EPF - Exame Parasitológico de Fezes

HPJ - Método de Hoffman, Pons e Janer (Método de sedimentação espontânea)

IL – Interleucina

MHC II – Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPG – Ovos por grama de fezes

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PCE - Programa de Controle da Esquistossomose

POC-CCA – *Point-of-care circulating cathodic antigen*

PCE - Programa de Controle da Esquistossomose

qRT-PCR - Transcrição Reversa em Tempo Real da Reação em Cadeia da Polimerase.

RNA - Ácido ribonucleico

SmATPDase - *Schistosoma mansoni* ATPDase

SMS - Secretaria Municipal de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Esquistossomíase mansônica	2
2.2 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose	3
2.3 Ciclo biológico e aspectos clínicos.....	4
2.4 Diagnóstico e tratamento	8
2.5 Fibrose Periportal e o uso do Ultrassom.....	10
2.6 Expressão das Ectonucleotidases na Esquistossomose.....	11
2.7 Resposta imunológica na esquistossomose.....	13
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 População e área de estudo	18
4.2 Questionário Demográfico e Socioeconômico.....	18
4.2 Aspectos éticos	18
4.3 Exame parasitológico de fezes	18
4.4 Exame ultrassonográfico.....	19
4.5 Obtenção dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	19
4.6 Extração de RNA a partir de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando o QIAamp viral RNA Mini Kit – QIAGEN	21
4.7 Síntese de DNA complementar e reação em cadeia da polimerase (qPCR).....	22
4.8 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	24
4.8.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PMBC).....	24
4.8.2 Obtenção de sobrenadante de cultura de PBMC.....	25
4.8.3 Medida de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC	25

4.9 Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Caracterização da população de estudo:	27
5.2 Avaliação da ecogenicidade periportal.....	31
5.3 Expressão de SmATPDase 1 e SmATPDase 2 em amostras fecais de indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	33
5.4 Perfil de citocinas de indivíduos infectados residentes em área endêmica.....	35
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. ANEXOS	761
8.1. ANEXO 1.....	71
8.2 ANEXO 2.....	74
8.3 ANEXO 3.....	76

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma parasitose de destaque mundial, estando presente em diversos países emergentes. Além disso, a parasitose pode causar importantes agravos clínicos que são dispendiosos do ponto de vista econômico para a saúde pública. A infecção é causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, e pode se manifestar sob diferentes formas clínicas, variando em graus de gravidade. Os sinais e sintomas podem ser decorrentes desde uma manifestação da fase aguda da doença, como uma simples dermatite cercariana e a forma intestinal com diarreias, dores abdominais e sensação de plenitude gástrica até o desenvolvimento de formas mais graves (fase crônica) como a hepatoesplênica, na qual se observa hipertensão portal, aumento do diâmetro do fígado, baço e fibrose periportal. (LAMBERTUCCI et al., 2000; PORDEUS et al., 2008; REY, 2018).

Diversos são os fatores que podem influenciar o desenvolvimento da infecção. As condições socioeconômicas estão fortemente atreladas, uma vez que a falta de saneamento básico, acesso a água tratada, baixa condição econômica e baixo grau de escolaridade já foram associados a infecção (ROLLEMBERG et al., 2015). Além disso, as características biológicas, como sexo e idade, também se mostram como fatores importantes, uma vez que os hábitos de vida dos indivíduos, como o maior contato de crianças e jovens com a água de rios e córregos para atividades de lazer e atividades laborais associadas a pessoas do sexo masculino garantem uma maior susceptibilidade à infecção (LIMA e COSTA et al., 1996; NETO et al., 2012, SANTOS; MELO, 2011; COURA-FILHO et al., 1994, 1995).

Apesar da existência de trabalhos na literatura que avaliam aspectos relacionados à esquistossomose mansoni humana, ainda não está claro quais são os fatores relacionados ao parasito e os mecanismos imunológicos relacionados ao hospedeiro envolvidos no estabelecimento das várias formas clínicas da doença, inclusive quais seriam os eventos iniciais que poderiam influenciar o desenvolvimento de um quadro de fibrose característico da evolução da doença. Entre os fatores de virulência descritos na literatura estão as duas isoformas das enzimas denominadas SmATPDases (SmATPDase 1 e SmATPDase 2). Apesar de possuírem diferentes propriedades catalíticas, ambas são responsáveis por realizarem a hidrólise do ATP extracelular, uma molécula inflamatória, gerando o metabólito adenosina, que é anti-inflamatório. Acredita-se que por meio da ação hidrolítica dessas enzimas, o parasita consiga modular a resposta imunológica do hospedeiro de modo a favorecer a sua sobrevivência. Diante da importância dessas enzimas, diversos estudos têm sido realizados por diferentes pesquisadores objetivando compreender o papel delas no desenvolvimento da doença. Estudos

tem demonstrado que as mesmas são expressas em todas as formas evolutivas do parasita, entretanto, diferem quantitativamente em sua expressão. Assim, a SmATPDase 1 é mais expressa no tegumento do verme e em menor quantidade nos ovos, enquanto que, a SmATPDase 2 possui ampla expressão nos ovos e no tegumento (DEMARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-GARCIA et al., 2007; MENDES et al., 2011; Da DARA et al., 2014; DE CASTRO et al., 2015; MUNIZ et al., 2015).

A resposta imune individual ao *S. mansoni* é altamente variável e as razões pelas quais alguns indivíduos infectados progridem para as formas clínicas mais graves da doença permanecem pouco entendidas. Entretanto, o perfil de citocinas que são produzidas durante a infecção estão associadas a forma clínica da doença. O que tem sido demonstrado é que na fase inicial da infecção ocorre o predomínio de uma resposta Th1, que tende a mudar para Th2 com o início da oviposição pelo parasita. Enquanto, citocinas provenientes da resposta do tipo Th17 e quimiocinas inflamatórias estão associadas a determinadas formas clínicas durante a infecção (MORAIS et al., 2008).

Nesse contexto, o estudo da produção de citocinas, bem como a identificação de fatores associados a sua produção são de grande valia para identificação dos mecanismos imunopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

Nesse estudo, nós caracterizamos o perfil de citocinas apresentado pelos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* residentes em área endêmica e analisamos a influência de fatores como idade, sexo, carga parasitária, alterações na ecogenicidade periportal e expressão de SmATPDases na resposta imunológica desses indivíduos. Esse trabalho constitui numa ferramenta importante para estabelecer proposições futuras, visando uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na esquistossomose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esquistossomíase mansônica

As esquistossomíases, também conhecidas como esquistossomoses ou bilharzioses são doenças causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Entre as espécies conhecidas, as de *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*) e *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) são os principais agentes etiológicos da infecção no homem. As espécies do gênero *Schistosoma* são originárias das bacias dos rios Nilo, na África, e do

Yangtze, na Ásia, e das espécies que parasitam o homem, apenas o *S. mansoni* é encontrado nas Américas do Sul e Central. A inserção do *S. mansoni* nesse continente é atribuída ao comércio de escravos. As outras espécies não são encontradas em tais américas devido à ausência de hospedeiros intermediários (caramujos) suscetíveis à infecção (BRASIL, 2014; REY, 2018).

A esquistossomose mansônica, popularmente conhecida no Brasil como "barriga d'água" e/ou "doença do caramujo", é uma doença de veiculação hídrica e de potencial endêmico (ROCHA et al, 2016). Em relação as Américas, o Brasil é o país com o maior número de casos e a sua expansão no país se deu por meio de movimentos migratórios que eram realizados para regiões com saneamento básico precário. Atualmente, a doença ainda conta com fatores que facilitam a sua propagação como a longevidade dos vermes que podem sobreviver até décadas, a grande capacidade de postura de ovos pelas fêmeas, presença de portadores que podem excretar ovos por mais de 20 anos se não tratados, o caráter insidioso da doença que dificulta o paciente procurar por tratamento, a elevada dispersão dos hospedeiros intermediários que facilitam a infecção e a precariedade do saneamento básico em áreas rurais e urbanas (BRASIL, 2014).

2.2 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é prevalente em áreas tropicais e subtropicais e, apesar dos dados serem escassos em relação ao número de casos de esquistossomose no mundo, a mesma é considerada como a segunda infecção parasitária mais importante no mundo, ficando atrás apenas da malária. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a transmissão da esquistossomose foi relatada em 78 países, desses, apenas 52 são endêmicos com transmissão moderada a alta (Quadro 1).

Quadro 1 – Distribuição geográfica da esquistossomose.

	ESPÉCIES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
Esquistossomose intestinal	<i>Schistosoma mansoni</i>	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname
	<i>Schistosoma japonicum</i>	China, Indonésia, Filipinas
	<i>Schistosoma mekongi</i>	Vários distritos do Camboja e da República Democrática Popular do Laos
	<i>Schistosoma guineensis</i> e <i>S. intercalatum</i>	Áreas de floresta tropical da África Central
Esquistossomose urogenital	<i>Schistosoma haematobium</i>	África, o Oriente Médio, Córsega (França)

Fonte: World Health Organization (2019).

Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas e que outras 779 milhões correm o risco de infecção pelo *S. mansoni* em todo o mundo. No Brasil, a parasitose é encontrada em todas as regiões do país e compreendem os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2014).

2.3 Ciclo biológico e aspectos clínicos

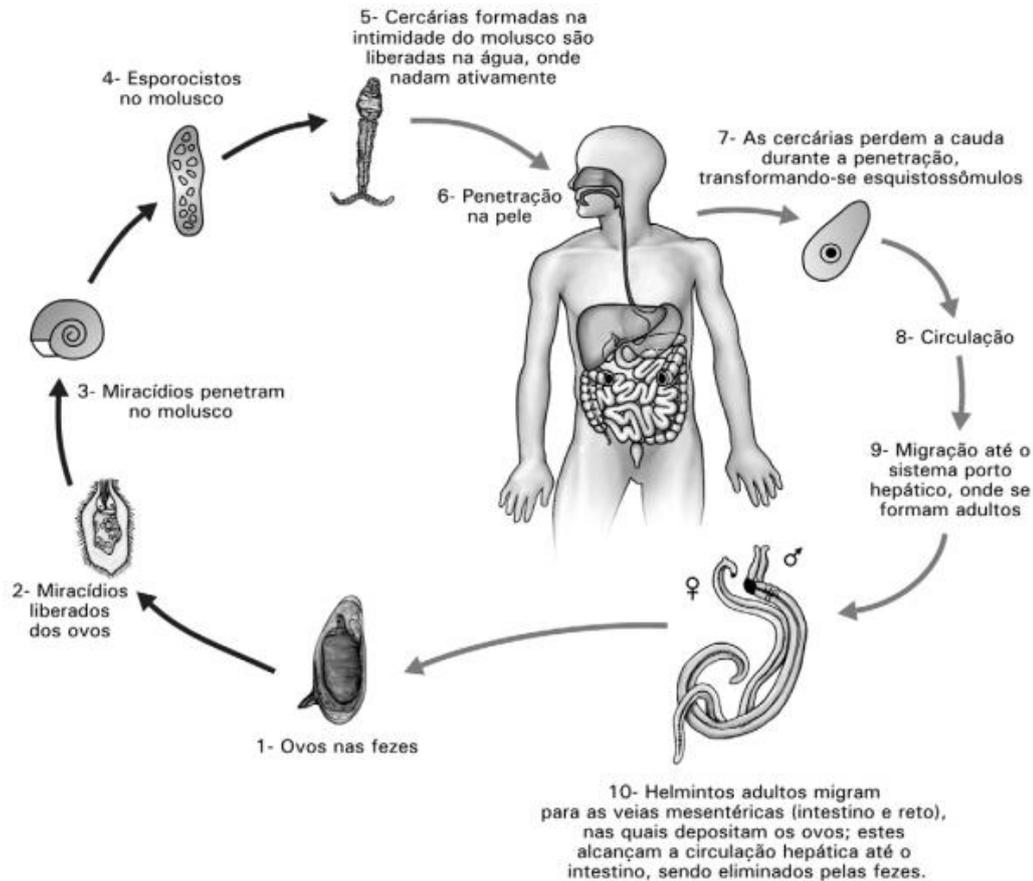
O ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* é heteroxênico e pode ser observado tanto a reprodução assexuada como a sexuada (Figura 1). No hospedeiro vertebrado, quando o parasita se torna adulto e está presente no sistema vascular do plexo venoso mesentérico, ocorre a cópula entre o macho e a fêmea. A fêmea fecundada, por meio da corrente sanguínea atinge as veias mesentéricas de menores calibres como a mesentérica inferior e inicia a postura dos ovos, alguns ovos atingem a corrente sanguínea e outros a luz intestinal, processo esse que demora

aproximadamente 20 dias. Os ovos que atingiram a luz intestinal são eliminados para o meio externo no bolo fecal (REY, 2018; SOUZA et al., 2011).

Os ovos do parasita contidos no bolo fecal em contato com coleção de água doce liberam os miracídios. A liberação do miracídio é influenciada por fatores como temperatura, luminosidade e níveis de oxigenação na água. Após a liberação do miracídio, o mesmo poderá penetrar indistintamente em moluscos vetores ou não. Os miracídios que penetraram em caramujos do gênero *Biomphalaria* se desenvolverão, uma vez que esses são os hospedeiros intermediários. Após a penetração, o miracídio perde cílios e se transforma em esporocistos, os esporocistos por poliembrionia da origem a esporocistos secundários e posteriormente, as cercárias. Por meio de vesículas tegumentares formada pelo tegumento do molusco as cercárias retornam à água, normalmente isso acontece nas horas mais quentes e luminosas do dia, entre 11 a 17 horas. Na água, elas nadam ativamente até encontrar algum hospedeiro definitivo, e caso isso não ocorra, elas podem sobreviver até no máximo 2 dias. Quando ocorre o encontro das cercárias com o hospedeiro definitivo como o homem, ocorre a penetração com o auxílio de secreções de glândulas e dos movimentos ativos (REY, 2018; SOUZA et al., 2011).

No homem, as cercárias se transformam em esquistossômulos e, os que não são destruídos durante a passagem na pele, vão para a circulação geral atingindo o coração, depois aos pulmões e, em seguida, ao fígado. No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos ingerem sangue, crescem e alcançam a fase adulta, dando origem a formas unissexuadas (macho e fêmea). Depois, migram acasalados, via sistema porta, até a artéria mesentérica inferior, onde farão a oviposição. Os ovos podem ser encontrados nas fezes 40 dias após a infecção (REY, 2018; SOUZA et al., 2011).

Figura 1: Ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SOUZA et al., 2011.

Uma série de fatores são importantes para a infecção e para o desenvolvimento da sintomatologia, como a linhagem do parasito, número de cercárias que penetraram no organismo (carga infectante), idade e vitalidade das cercárias, frequência das reinfecções, características do hospedeiro como idade, ocupação, nutrição, hábitos, entre outros. Sendo assim, os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* podem ser assintomáticos ou apresentar alguma das formas clínicas da doença. A fase aguda (inicial), é usualmente caracterizada pelo desenvolvimento da dermatite cercariana, na qual ocorre exantema, prurido e outras manifestações alérgicas no local de penetração da (s) cercária (s). Além da dermatite, a forma toxêmica da esquistossomíase também pode ocorrer na fase aguda, sendo caracterizada pela manifestação de febre, eosinofilia, linfadenopatia, esplenomegalia e urticária. Essa reação está associada a sensibilidade do hospedeiro ao parasita e ao número de parasitas infectantes (REY, 2018).

Depois de seis meses da infecção, a doença pode se cronificar e o indivíduo pode desenvolver a forma intestinal, hepatointestinal ou hepatoesplênica da doença, sendo mais

frequentemente observados em áreas endêmicas para esquistossomose. Na forma intestinal os sintomas presentes são anorexia, sensação de plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, astenia, irritabilidade, alternância entre diarreia e constipação, cólicas intestinais e tenesmo. Nessa fase, o nível de excreção de ovos nas fezes se mantém estável. Na forma hepatointestinal, os sintomas são os mesmos da forma intestinal só que mais intensos e acompanhados de uma leve hepatomegalia. A forma mais grave da doença é a hepatoesplênica, nessa fase ocorre esplenomegalia, varizes esofágicas, ascite, edema e *cor pulmonale* originados da hipertensão periportal provocada pelo fígado com fibrose (LAMBERTUCCI et al., 2000; PORDEUS et al., 2008).

Parte dos ovos que não foram eliminados nas fezes atingem a corrente sanguínea e migram para diferentes órgãos como o fígado. No fígado, esses ovos ficam “presos” em pequenos ramos venosos dando origem a uma reação granulomatosa no local, em razão da estimulação antigênica dos ovos. O granuloma formado é decorrente de uma reação imunológica que busca proteger o tecido do hospedeiro, mas que acaba também por proteger o ovo. O miracídio sobrevive dentro do ovo por até 20 dias e após a sua morte, células inflamatórias absorvem o ovo. Entretanto, pode acontecer do granuloma não ser completamente absorvido e ficar resquícios de fibrose tecidual (GOMES; DOMINGUES; BARBOSA, 2017; REY, 2018).

Durante a formação do granuloma se observa a participação de células como eosinófilos, macrófagos, monócitos, linfócitos e fibroblastos. Todavia, sua formação ocorre por meio de uma reação de hipersensibilidade tardia mediada pelos linfócitos CD4 T - helper (Th0) que dependendo das citocinas presentes no meio podem se diferenciar em células Th1, que são produtoras de IL2, INF- γ , e TNF- α ou células Th2 produtoras de IL4, IL5, IL10 e IL13. Na fase aguda é observada a predominância da resposta Th1, que induz reações inflamatórias e na fase crônica a resposta Th2 que estimula a produção de anticorpos, especialmente IgE, aumentando também a quantidade de eosinófilos. Tais ações culminam na diminuição da reação inflamatória ao redor dos ovos, diminuindo o tamanho dos granulomas. É importante mencionar também, que ocorre uma regulação entre os dois tipos de respostas, que é dependente das citocinas IL10 e IL12 (GOMES; DOMINGUES; BARBOSA, 2017).

Dados da literatura evidenciam que a prevalência das formas clínicas graves da esquistossomose varia de forma considerável entre diferentes áreas endêmicas. Embora tenha sido sugerido que o maior risco de desenvolvimento da fibrose ocorra nos indivíduos com maior intensidade de infecção, comunidades bem definidas, com semelhantes níveis de exposição, apresentaram diferenças marcantes na prevalência dessas formas (FULFORD et al., 1998). Em

geral, o pico de intensidade de infecção ocorre em média cinco anos antes do pico de prevalência da fibrose periportal, e essa fibrose se manifesta de uma forma mais branda nos indivíduos mais jovens quando comparado aos indivíduos mais velhos. Isso sugere que uma minoria dos indivíduos infectados não controla a inflamação hepática inicial e desenvolvem a forma grave hepatoesplênica, mesmo que a intensidade de infecção desses indivíduos decline com a idade. Essas informações sugerem que outros fatores tais como idade, sexo, estado nutricional, aspectos genéticos, intensidade da resposta imune aos antígenos de ovo, poderiam influenciar a progressão da forma clínica assintomática para as formas mais graves (ARAP SIONGOK et al., 1976; BUTTERWORTH et al., 1985; DESSEIN et al., 1992; GRYSEELS 1994; BETHONY et al., 1999; NAUS et al., 2003, BOOTH et al., 2004). Diversos estudos têm demonstrado uma maior ocorrência de esquistossomose em indivíduos do sexo masculino, que em muitas vezes está associado com os hábitos laborais como pescar, trabalhar em valas, entre outros (LIMA e COSTA et al., 1996). Estudos também indicam que crianças e adultos jovens são os mais afetados, provavelmente devido aos hábitos recreativos como tomar banho, brincar em rios, córregos, e realização de atividade laborais no caso de indivíduos jovens adultos (NETO et al., 2012; SANTOS; MELO, 2011; COURA-FILHO et al., 1994, 1995). Os indivíduos que apresentam baixo nível de renda (ROLLEMBERG et al., 2015) e de escolaridade também estão entre os mais afetados. Outros fatores como a falta de saneamento básico, a ausência de água tratada para o consumo e o contato constante com águas naturais (REY, 1999) são fatores importantes para a transmissão da esquistossomose mansoni (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

2.4 Diagnóstico e tratamento

Como os sinais e sintomas manifestados pelos pacientes com esquistossomose podem ser semelhantes a outros agravos, o diagnóstico deve ser realizado com o apoio dos exames laboratoriais, empregando métodos diretos e/ou indiretos. O método direto buscar identificar as formas evolutivas do parasita como os ovos nas amostras fecais, e para isso, pode ser empregado a técnica de Kato- Katz, a qual é recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Esta técnica além de permitir a visualização dos ovos, também permite realizar sua contagem, fornecendo um panorama da intensidade de infecção. O método de Kato-Katz é recomendado pela OMS devido ao fato de ser o exame parasitológico de fezes mais rápido, de fácil execução e sensível (KATZ; ALMEIDA, 2003). A técnica de sedimentação espontânea, ou de Lutz,

também conhecida por Hoffman, Pons e Janer (HPJ) também é um método direto sendo o mais utilizado em laboratórios de análises clínicas, entretanto, é um método qualitativo.

Outro método que têm sido estudado e vem sendo apontado como um possível candidato para substituir o Kato-Katz é o *Point-of-care circulating cathodic antigen* (POC-CCA) onde é utilizada uma gota de urina, detectando antígeno do *S. mansoni* em uma membrana contendo anticorpos. O teste rápido POC-CCA® apresenta algumas vantagens adicionais sobre as técnicas parasitológicas tradicionais. Isso inclui facilidade de uso e operação, estabilidade em altas temperaturas e curto período de tempo necessário para testes, ausência da necessidade de instrumentos específicos como microscópio, além do fato de trabalhar com amostras de urina, que são menos invasivas e mais fáceis de obter. No entanto, alguns problemas com o teste permanecem, incluindo a ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos o que proporciona custos mais altos como resultado de um tratamento excessivo. Trabalhos recentes concluíram que o teste não possui a sensibilidade para ser usado como ferramenta de diagnóstico independente, sendo o Kato-Katz ainda o teste padrão ouro para diagnóstico da doença em áreas endêmicas (SIQUEIRA et al., 2016).

Um estudo realizado por Silveira et al. (2016) nos municípios de Manhuaçu e Governador Valadares buscou avaliar o desempenho do CCA em indivíduos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* moradores de área endêmica e não endêmica para a doença. O estudo demonstrou que a leitura visual do resultado obtido do teste como “traço”, influenciou diretamente a sensibilidade e especificidade do método. Além disso, o método diagnosticou 15% dos indivíduos que foram considerados positivos pelo método de kato-katz como negativos. Esses indivíduos, considerados falso negativos, possuíam, em grande parte, uma infecção leve com uma carga parasitária menor que 100 OPG. Entretanto, o método apresentou uma boa sensibilidade e especificidade em indivíduos que apresentaram uma CP moderada e alta. Os resultados indicam que em áreas onde as intensidades de infecções são leves, o teste não possui a sensibilidade para ser usado como ferramenta de diagnóstico independente, mas poderia ser utilizado em conjunto com outros métodos. Outros métodos diretos, mas menos utilizados são a técnica da eclosão dos miracídios, ELISA de captura e as biópsias retal e hepática.

Os métodos indiretos são aqueles que utilizam a reação antígeno e anticorpo, quando os resultados são positivos, não indicam obrigatoriamente infecção ativa, pois a positividade pode ocorrer devido à presença de anticorpos que podem permanecer após a cura da infecção. Os principais métodos indiretos são: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência (IF) e reação peri-ovular (RPOV) (BRASIL, 2014; REY, 2018).

O tratamento da esquistossomose além de buscar a cura da doença, procura também evitar o desenvolvimento das formas graves. As condutas clínicas a serem tomadas podem diferir dependendo da fase da doença em que o paciente se encontra. Na fase inicial, na dermatite cercariana o tratamento pode ser composto pelo uso de anti-histamínicos e corticosteroides tópicos, associados à oxaminiquine ou praziquantel. Em casos de febre toxêmica pode ser necessário a internação e uso de analgésicos, antiespasmódicos e antitérmicos. Na fase crônica, nas formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, podem ser utilizados medicamentos para quadros diarreicos quando necessário, além dos medicamentos específicos (oxaminiquine ou praziquantel). A forma hepatoesplênica pode necessitar de outras condutas para reduzir o risco de hemorragia digestiva (VITORINO et al., 2012; REY, 2018).

2.5 Fibrose Periportal e o uso do Ultrassom

Entre as formas clínicas da esquistossomose, a hepatoesplênica pode ser considerada a mais grave, uma vez que pode afetar além do sistema porta, o baço e a vesícula biliar. Em mais de 50% dos casos, o fígado pode pesar mais que 1.500 g. Além disso, baço e o lobo esquerdo se encontra aumentado, enquanto que o direito se encontra reduzido. Para a identificação da forma hepatoesplênica em pacientes com esquistossomose, podem ser empregados métodos como esplenoportografia, tomografia computadorizada e a cintilografia, além da ultrassonografia, só possível com o advento do ultrassom portátil que permitiu determinar com maior precisão o estágio evolutivo da doença nas áreas endêmicas. É a técnica mais utilizada devido ao baixo custo e a praticidade de aplicação em campo em relação as outras técnicas, além disso, permite a detecção do espessamento fibroso periportal que afeta a veia porta no hilo hepático e os ramos intra-hepáticos do sistema porta, tais alterações são demonstradas pelo equipamento como regiões de hiperecogenicidade periportal (MACHADO et al., 2002). Os indivíduos portadores da fase crônica passaram a ser agrupados de acordo com o grau de ecogenicidade, expressão da fibrose periportal. (ABDEL-WAHAB et al., 1992; MOHAMED-ALI et al., 1999; LAMBERTUCCI et al., 2000; RICHTER et al., 2003). O método possui uma boa aplicação, e em um estudo realizado em 2010 por Azeredo *et al.*, foi possível correlacionar a frequência dos sinais ultrassonográficos com o nível endêmico das áreas estudadas e o estágio da doença nas populações.

2.6 Expressão das Ectonucleotidases na Esquistossomose

Parasitas do gênero *Schistosoma* não são capazes de realizar a síntese “de novo” de nucleotídeos purínicos. Para satisfazer sua demanda desses nucleotídeos, eles necessitam utilizar da via de salvação de purinas pré-formadas no meio extracelular e interiorizar essas moléculas, transportando-as através de sua membrana plasmática (MARR et al., 1978; SILVA, 2016). Enzimas expressas por esses parasitos, dentre elas as ectonucleotidases, podem quebrar o ATP extracelular, gerando o metabólito adenosina, que posteriormente poderá ser utilizado pelas vias de salvação (MEYER - FERNANDES, 2002), ou internalizado via transportadores específicos (YE; RAJENDRAN, 2009). Dentre as enzimas que podem ser encontradas no tegumento do *S. mansoni* estão duas isoformas da ATP difosfohidrolases (EC 3.6.1.5) também chamadas de NTPDases, apirases e SmATPDases. As duas enzimas possuem aproximadamente 63 kDa e diferentes características como solubilidades e propriedades catalíticas (VASCONCELOS et al., 1993, 1996; FARIA-PINTO et al., 2004).

No *S. mansoni* existe uma ampla expressão de ATP difosfohidrolase em todas as fases do ciclo de vida do parasito no hospedeiro e estudos iniciais sugeriram que as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* são antigênicas e podem contribuir com a capacidade desse parasito de minimizar o ataque imune e o risco de trombose, favorecendo sua mobilidade intravascular. Enquanto a SmATPDase 2 é expressa em todos os estágios de vida do parasito, sendo eles: cercária, esquistossômulo, verme adulto, ovos e miracídeo; a SmATPDase 1 apresenta uma baixa expressão em ovos. Contudo, ambas as enzimas já foram parcialmente purificadas tanto do tegumento de verme adulto quanto de preparações homogêneas de ovos (VASCONCELOS et al. 1993; DEMARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-GARCIA et al., 2007; MENDES et al., 2011; Da DARA et al., 2014; DE CASTRO et al., 2015; MUNIZ et al., 2015). Um estudo realizado por Levano-garcia detectou a presença de ambas as proteínas SmATPDases no tegumento basal de *S. mansoni* e membranas apicais, mas apenas SmATPDase 2 no sincício do tegumento e no sobrenadante de meio de cultura após a incubação de vermes adultos *in vitro*, indicando que essa enzima é secretada pelo parasita.

O ATP é uma molécula que desempenha o armazenamento de energia nas células. Entretanto, quando o ATP é encontrado no meio extracelular em altas quantidades, o mesmo é interpretado pelo organismo como possibilidade de estar ocorrendo uma injúria celular, o que desencadeia o início de uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento de citocinas como IL-12 e TNF- α e IFN- γ . Enquanto que, a adenosina tem efeitos contrários ao ATP, uma vez que desempenha propriedades imunomoduladoras, através da inibição da produção de

citocinas inflamatórias e da estimulação da síntese de IL-10 (MIZUMOTO et al., 2002; MARCUS et al., 2003).

Todas as respostas mediadas pelo ATP extracelular são iniciadas pela ativação de receptores purinérgicos conhecidos como receptores P2. Os receptores P2 ainda são subdivididos em dois subgrupos: receptores P2X, que são associados a canais iônicos, e receptores P2Y, que são receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (DI VIRGILIO et al., 2001; BOURS et al., 2006). Já foram descritos sete receptores P2X (P2X₁₋₇) e todos eles respondem primariamente ao ATP (DI VIRGILIO et al., 2001). A adenosina exerce seus efeitos por meio de 4 subtipos de receptores, conhecidos como receptores P1 que são divididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, e variam em distribuição celular, afinidade e funções. Os quatro receptores de adenosina são membros da família de receptores acoplados à proteína G (ABBRACCHIO; CERUTI, 2007), e podem ativar diferentes vias de sinalização. Os receptores A₂ são responsáveis pela resposta anti-inflamatória da adenosina, envolvendo aumento de AMP cíclico e consequente inibição da resposta imune das células. Por outro lado, os receptores A₁ e A₃ parecem regular a ação dos receptores A₂, prevenindo um excesso de inibição das células imunes, levando a inibição da produção de AMP cíclico e aumento na concentração de cálcio intracelular (ABBRACCHIO; CERUTI, 2007; SCHULTE, FREDHOLM, 2003). Segundo, Bhardwaj e Skelly (2009) a diminuição do ATP e ADP em torno dos parasitas poderia exercer um efeito antitrombótico ao inibir a agregação plaquetária, permitindo uma maior mobilidade do parasita nos vasos sanguíneos.

Diversos estudos tem demonstrado a importância do sistema purinérgico na esquistossomose. Um estudo utilizando camundongos infectados com *S. mansoni* observou que o bloqueio do receptor P2Y_{12R} em eosinófilos levou há uma redução no tamanho do granuloma hepático, uma diminuição na contagem de eosinófilos no granuloma, uma redução na deposição de colágeno e um aumento na produção de IL-13 / IL-4 no fígado, sem afetar a oviposição do parasito (MUNIZ et al., 2015). Um outro trabalho demonstrou que camundongos infectados com *S. mansoni* produziam maiores níveis de TGF- β que desencadeavam uma menor expressão de receptores P2X₇ na superfície de macrófagos. A ativação desse receptor está associada a liberação de IL-1 β e TNF α , logo, uma menor ativação do receptor promoveria uma menor secreção de IL-1 β , o que afetaria a ativação do inflamassoma (OLIVEIRA et al., 2014).

A utilização dessas ectonucleotidases como alvos de vacina ou drogas pode neutralizar a interferência dos esquistossomas na sinalização da resposta imune do hospedeiro (FOSTER; JOHNSTON, 2002; VERJOVSKI- ALMEIDA et al., 2003; BRASCHI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Os projetos genômico e proteômico envolvendo o parasito *S. mansoni* têm

analisado as seis fases do ciclo biológico, concentrando esforços na identificação dos genes correspondentes às proteínas expostas na superfície do parasito ou secretadas, e que são expressas durante a passagem no hospedeiro mamífero. Estas proteínas são de particular importância, desde que são candidatas à produção de vacinas ou alvos terapêuticos (FOSTER; JOHNSTON, 2002; VERJOVSKI- ALMEIDA et al., 2003; BRASCHI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Notavelmente, a categorização dos genes pelo programa “Gene Ontology” identificou os genes das isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* entre aqueles que deverão ser investigados (VERJOVSKI- ALMEIDA et al., 2003; BRASCHI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). A participação dessas enzimas no processo de evolução da doença foi descrita uma vez que novas drogas esquistossomicidas, os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos, foram capazes de promover a inibição da atividade hidrolítica das isoformas presentes no tegumento do verme adulto e também da apirase de batata (PENIDO et al., 2007). Além disso, foi demonstrado por Aleixo de Carvalho et al. (2015) e De Castro et al. (2015) o papel da ATP difosfohidrolase na eliminação dos vermes adultos, uma vez que em ambos os estudos foram descritos extratos de plantas, Licoflavona B e Cardomonina, com atividade esquistossomicida devido a capacidade de inibir a atividade dessa enzima.

2.7 Resposta imunológica na esquistossomose

Durante a etapa inicial da infecção pelo *S. mansoni*, a primeira barreira imunológica a ser vencida pela cercária é a pele. Em um estudo utilizando camundongos infectados com cercárias da linhagem *T. regenti*, foi demonstrado que durante a passagem das cercárias na pele, ocorre uma resposta inflamatória com a participação de neutrófilos, macrófagos, linfócitos CD4⁺ e mastócitos. Em camundongos que tiveram primo-infecção, foi demonstrado que inicialmente a resposta era mista (Th1 e Th2) e caracterizada pelo aumento das citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-6. Enquanto que, nos camundongos que tiveram reinfecção predominou uma resposta Th2 com maiores níveis de IL-4 e IL-5 (LICHTENBERGOVÁ et al., 2008).

Após os vermes se tornarem adultos e se alojarem em vasos mesentéricos o parasita secreta antígenos do intestino e do tegumento. Esses antígenos estimulam uma resposta inflamatória caracterizada por citocinas como IL-2 e IFN- γ . Quando a oviposição é iniciada, observa-se também uma reatividade inflamatória aos ovos, que é agravada após a liberação de antígenos solúveis pelos ovos, provocando uma reação granulomatosa. Os antígenos

provenientes dos ovos são processados e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais incluem células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Sequencialmente, ocorre a ativação dos linfócitos T pelas APCs por meio de moléculas como o MHC II e coestimuladores como B7 que se associam à célula T via ligação com CD28 (LINSLEY et al., 1990 apud FARIA, 2004). Após a ativação, os linfócitos T CD 4⁺ secretam citocinas que vão regular a formação do granuloma e o perfil da resposta que era do tipo Th1 passa a ser do tipo Th2 com o predomínio das citocinas IL-4 e IL-5 (WEINSTOCK; BLUM, 1987 apud FARIA, 2004).

Estudos realizados em camundongos e em seres humanos infectados pelo *S. mansoni* tem caracterizado a esquistossomose como uma doença predominantemente do tipo Th2, implicando a produção deste perfil de citocinas como a causa da morbidade prejudicial ao hospedeiro (DE JESUS et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005). Entretanto, dados de um estudo realizado com camundongos infectados demonstram que a resposta do tipo Th2 é importante para a sobrevivência do hospedeiro (FALLON et al., 2000). Além disso, estudos em seres humanos, avaliaram o perfil de citocinas associado com a doença e sugeriram que uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1 é a causa da morbidade (HENRI et al., 2002; MORAIS et al., 2008).

Um estudo realizado por Morais et al. (2008) demonstrou que na fase aguda há uma associação na expressão de citocinas do tipo Th1 e Th2 com predominância das citocinas do tipo 1, onde se observa altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10, nessa fase também se observa um aumento no número de eosinófilos e produção de IgE (CALDAS et al., 2008). Pacientes com a forma intestinal exibem uma resposta mista Th1/Th2 com altos níveis de IL-4 em comparação a fase aguda e também sucede aumento na frequência de células T produtoras de IL-10. Os pacientes portadores da esquistossomose hepatointestinal (EHI) reagem aos antígenos do *Schistosoma* com um perfil dominante de citocinas Th2, apresentando um aumento na produção das citocinas IL-4 e IL-5, entretanto, apresentam pouca IL-10 quando comparados com pacientes na forma intestinal. Em contraste, pacientes hepatoesplênicos têm uma fraca resposta Th2 associada com o aumento na produção de IFN- γ e TNF- α , e diminuição da expressão das citocinas IL-5 e IL-10, o que leva ao desenvolvimento de uma resposta imunológica predominantemente pró-inflamatória (ABATH et al., 2006; BURKE et al., 2009; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2008). Entretanto, baixos níveis na produção de IFN- γ e níveis elevados das citocinas TNF- α , IL- 4, IL- 5, IL-10 e IL-13 têm sido associados com um aumento no risco de desenvolver fibrose hepática severa na esquistossomose (ALVES-OLIVEIRA et al., 2006; DE JESUS et al., 2004). Henri et al. (2002) em um trabalho realizado em uma população

sudanesa mostraram que a produção de IFN- γ em culturas de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com fibrose periportal moderada a severa é menor do que em culturas de indivíduos com fibrose periportal leve, enquanto que altos níveis de TNF- α estavam associados com a fibrose periportal moderada a severa. Esses dados sugerem, que o IFN- γ pode exercer um importante papel na proteção contra a fibrose periportal, enquanto que o TNF- α pode agravar a fibrose em indivíduos cronicamente infectados. O TNF- α produz este efeito por meio da indução do metabolismo do colágeno encontrado na matriz extracelular e, as células de Kupffer, aumentando a produção de proteínas da matriz extracelular. Enquanto que o IFN- γ atua na regulação da ativação de fibroblastos e na síntese de colágeno através da inibição da diferenciação das células estreladas hepáticas e, conseqüentemente, na produção de matriz extracelular. (HENRI et al., 2002).

Na esquistossomose masônica murina, trabalhos têm associado o início da inflamação granulomatosa a uma resposta Th1 de curta duração. Todavia, outros estudos na literatura apontam que as alterações patológicas na esquistossomose são decorrentes de citocinas do tipo Th2 (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 1999), em que as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 contribuem para a formação do granuloma e a presença de eosinófilos nessas lesões (CHIARAMONTE et al., 2001). Os achados nos diferentes estudos sugerem que não há um consenso sobre qual perfil de produção de citocinas, tipo Th1 ou Th2, é responsável pela morbidade observada na esquistossomose humana, sugerindo que o resultado da doença é influenciado pela natureza da resposta imune Th1/Th2 contra antígenos do *Schistosoma* (ABATH et al., 2006).

Vários estudos foram realizados para determinar o papel de certas citocinas na fibrogênese. Fallon et al. (2000) verificaram que a remoção da IL-13 em camundongos infectados com o *S. mansoni* é benéfica para a sobrevivência do hospedeiro. Este prognóstico correlaciona-se com uma redução na deposição de colágeno, indicando que a IL-13 exerça um papel no desenvolvimento da fibrose hepática. O papel fibrogênico da IL-13 parece provir de sua habilidade junto com a IL-4 em induzir a produção da enzima arginase em macrófagos. Essa enzima usa a L-arginina como um substrato para produzir a L-ornitina que é convertida em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e conseqüentemente, no desenvolvimento da fibrose (PEARCE; MACDONALD, 2002; WILSON et al., 2007).

A participação de IL-5, TNF- α , IL-13, MIP-1 α e RANTES nas respostas imunológicas de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal foi demonstrado em um estudo com indivíduos apresentando diferentes graus de fibrose. A produção de IL-5 em resposta a estímulo

com SEA mostrou-se elevada em indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparado a indivíduos sem fibrose. Por outro lado, os níveis de IL-13 e MIP-1 α se mostraram elevados em indivíduos sem fibrose quando comparados aos indivíduos com fibrose moderada ou grave. Esse fato mostra uma relação importante das citocinas IL-5 e TNF- α nas alterações hepáticas provocadas pelo *S.mansoni* (DE SOUZA et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* residentes em área endêmica. Além disso, pretende-se analisar a influência da idade, sexo, carga parasitária, alterações na ecogenicidade periportal e expressão de SmATPDases na resposta imunológica desses indivíduos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a carga parasitária dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.
- Avaliar aspectos sociodemográficos.
- Avaliar os participantes quanto aos aspectos clínicos e ultrassonográficos.
- Realizar a obtenção dos ovos de *S. mansoni* através da coleta de fezes.
- Determinar a expressão das ectonucleotidases (SmATPDase 1 e SmATPDase 2) em amostras de fezes.
- Correlacionar a carga parasitária, aspectos sociodemográficos, alterações na ecogenicidade periportal e expressão de ectonucleotidases com o perfil de citocinas observado nos participantes do estudo.

4. METODOLOGIA

4.1 População e área de estudo

O estudo foi realizado nos distritos rurais de Xonin de Baixo e Xonin de Cima, pertencentes ao município de Governador Valadares, estado de Minas Gerais, Brasil. Os indivíduos que desejaram participar do estudo receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), o qual foi assinado pelos pacientes, parentes ou responsáveis. Para os participantes menores de 18 anos o termo de assentimento foi assinado. Os modelos dos documentos encontram-se em anexo.

4.2 Questionário Demográfico e Socioeconômico

O questionário foi aplicado aos participantes do estudo e continha perguntas referentes aos dados demográficos tais como idade, sexo, local de moradia, nível educacional, ocupação e dados relacionados à infecção, como primo-infecção ou reinfeção (Anexo 1).

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF através da Plataforma Brasil. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo todas as informações dos procedimentos a serem realizados durante a pesquisa foi obtido de todos os participantes (Anexo 2). Para os indivíduos menores de 18 anos, foi obtido o termo de assentimento e a inclusão foi realizada após assinatura do consentimento pelos pais ou responsáveis (Anexo 3).

4.3 Exame parasitológico de fezes

A presença do parasito foi detectada pelo método de Kato-Katz utilizando duas lâminas a partir de amostras fecais de cada paciente de acordo com o preconizado pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) (WHO 1994) e pelo método de sedimentação espontânea (HPJ) (HOFFMAN et al., 1934). O número de ovos por grama de fezes foi determinado através do exame de duas lâminas de amostras de fezes de cada paciente de acordo com o método Kato-

Katz (KATZ et al., 1972), sendo que foram coletadas três amostras fecais por paciente. A contagem de ovos é resultado da média aritmética das três determinações e definida como opg (ovos por grama) de fezes. Os exames são rotineiramente realizados por professores, técnicos e estudantes da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares.

4.4 Exame ultrassonográfico

Todos os participantes foram submetidos à ultrassonografia abdominal por meio do aparelho portátil GE LOGIQ book series. Os parâmetros como diâmetro das veias porta e mesentérica, tamanho do fígado e baço e espessamento da parede dos ramos portais central e periférico foram avaliados segundo Homeida et al. 1988, Abdel-Wahab et al. 1992 e Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992. Nesse estudo adotou-se a classificação da Organização Mundial de Saúde (1991) para avaliar a morbidade pela infecção pelo *S. mansoni*: grau zero, espessamento da parede dos ramos periportais menor que 3 mm; grau 1, fibrose entre 3-5 mm; grau 2, fibrose entre 6-7 mm; e, grau 3, > 7 mm.

4.5 Obtenção dos ovos de *Schistosoma mansoni*

As amostras de fezes foram coletadas de indivíduos portadores do *Schistosoma mansoni*, identificados através do exame parasitológico de fezes pelo método Kato Katz, realizado pelo serviço público de saúde de Governador Valadares nos distritos de Xonin de Baixo e Xonin de Cima. Cada indivíduo positivo para ovos de *S. mansoni* forneceu três amostras de fezes coletadas em dias alternados. As amostras foram entregues pelos participantes do estudo no posto de saúde do próprio distrito, posteriormente, essas amostras foram levadas ao laboratório de parasitologia da UFJF - GV para manipulação. Primeiramente retirou-se uma pequena parte da amostra para realização da técnica de kato-katz, na qual foram preparadas duas lâminas dessa amostra para quantificação dos ovos de *S. mansoni*. Em um segundo momento preparou-se o restante da amostra para a técnica de HPJ, adicionando água retirada de uma torneira com filtro, homogeneizando e passando o material devidamente diluído por uma gaze dobrada em quatro partes até que todo o bolo fecal fosse devidamente filtrado. Após filtração a amostra foi separada em seis cálices distintos. Cada cálice foi completado com água filtrada para lavar cada parte da amostra e esperou-se cerca de 40 a 50 minutos até que a parte mais densa da amostra decantasse. Após a decantação, a parte líquida foi retirada, deixando assim apenas o precipitado. Novamente foi adicionado água até completar o cálice de

modo que ambas as partes da amostra ficavam cada vez mais claras. Essa lavagem foi realizada três (03) ou quatro (04) vezes, dependendo da turbidez da amostra. Após as lavagens, foi realizada a confirmação da presença de ovos de *S. mansoni* pelo exame parasitológico de fezes (EPF), no qual foi observado cerca de duas a três lâminas por cálice. O material presente nos seis (6) cálices foi unido em um só cálice e deixado em repouso para nova decantação. Após decantação a parte líquida foi retirada e posteriormente foi adicionada solução salina 0,9% gelada com o objetivo de impedir a eclosão dos ovos de *S. mansoni*.

Após essa etapa, prepararam-se as peneiras para a retirada das partículas maiores do que os ovos de *S. mansoni*. A peneira com orifícios de 300 micras foi posicionada na parte superior seguida da peneira de orifícios com 180 micras na parte inferior e tendo por baixo das peneiras um recipiente de alumínio acoplado para receber o material filtrado. Após organizar as peneiras verteu-se toda a solução sobre as mesmas e as partículas maiores que trezentos micras ficaram retidas na primeira peneira e as partículas maiores que cento e oitenta micras retidos na segunda peneira. As partículas menores que cento e oitenta micras incluindo os ovos de *S. mansoni* passaram por ambas as peneiras e foram captadas pelo recipiente de alumínio acoplado na parte inferior às peneiras. Após esperar algum tempo, 5 a 10 minutos, o recipiente de alumínio da base foi trocado por outro recipiente idêntico e o material presente no recipiente retirado foi vertido lentamente sobre o conjunto de peneira de forma que partículas densas ficavam presas no fundo do recipiente.

Os ovos de *S. mansoni* possivelmente retidos no fundo do recipiente de alumínio foram lavados com uma pequena quantidade de solução salina 0,9% gelada de modo que todas as partículas retidas se desprendessem e se misturassem à solução. A solução formada após a lavagem do recipiente de alumínio foi vertida em um cadinho e posteriormente agitada em sentido circular de modo que as partículas mais densas, incluindo os ovos de *S. mansoni*, se acumulavam no fundo desse recipiente. Após a agitação, as partículas mais densas foram retiradas com micropipetas e adicionadas em microtubos de 1,5 mL (livres de RNase, DNase e pirogênicos). Anterior ao armazenamento das amostras nos microtubos descritos acima, foi certificada a presença de ovos de *S. mansoni* através da observação de lâminas em microscópio óptico. Não foi possível observar ovos em todas as amostras, apesar do resultado do EPF ter sido positivo. Após encerrar a coleta dos ovos em microtubos, os mesmos foram levados à centrifuga por um minuto e meio para que as partículas de maior densidade se precipitassem. Após centrifugação, a solução salina foi retirada e o precipitado ressuspensionado em solução de RNA later para conservação do RNA presente na amostra. Cada microtubo foi armazenado a temperatura de quatro graus Celsius até realização da extração de RNA.

4.6 Extração de RNA a partir de ovos de *Schistosoma mansoni* utilizando o QIAamp viral RNA Mini Kit – QIAGEN

O conteúdo presente nos microtubos foi triturado utilizando um homogeneizador de tecidos (POLYTRON), logo, os ovos de *S. mansoni* também foram triturados. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para garantir a completa dissociação das nucleoproteínas. Logo após, 140 µL da amostra de fezes foram adicionadas a 560 µL da solução de tampão AVL para lise contendo RNA carreador, e misturadas em vórtex por 15 segundos. Posteriormente, foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas para remover gotas no microtubo. Após a centrifugação, foram adicionados 560 µL de etanol e a solução foi novamente misturada em vórtex por 15s. Foi realizada outra centrifugação a fim de remover as gotas existentes. Por fim, desta solução foram retirados 630 µL e aplicados à Mini coluna QIAamp com um tubo de coleta de 2 ml acoplado e em seguida levado para a centrifugação a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Ao término da centrifugação, as partículas como o RNA, ficaram retidas na coluna e o filtrado foi descartado. Foi realizado outra filtração para aumentar a quantidade de RNA, na qual foi utilizado o mesmo volume de solução e as mesmas condições para a centrifugação. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de tampão AW1 às Mini colunas QIAamp, e uma nova centrifugação foi realizada a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min para a realização da lavagem. Após centrifugação o filtrado foi descartado e outra lavagem foi realizada utilizando 500 µL de tampão AW2, sob uma centrifugação à velocidade máxima (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 3 min. Foi utilizado dois tampões de lavagem diferentes, AW1 e AW2 para melhorar a pureza do RNA eluído.

Para realizar a eluição do RNA presente na coluna, foram adicionados 60 µL de tampão AVE e a mesma foi incubada à temperatura ambiente durante 1 min. Logo após, foi realizada uma nova centrifugação a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min com a mini coluna contendo o tampão. O Tampão AVE é livre de RNase e contém 0,04 % de azida de sódio para evitar crescimento microbiano e contaminação com RNases. Todas as etapas da extração foram realizadas à temperatura ambiente e posteriormente, o RNA eluído foi levado para leitura a 260 e 280 nm no espectrofotômetro. A quantificação do RNA foi realizada por meio da seguinte equação: Concentração (µg/µL) = $A_{260} \times 40 \times \text{diluição} / 1000$. O RNA foi armazenado em freezer – 80 °C juntamente com a solução de AVE até a realização da transcrição reversa.

4.7 Síntese de DNA complementar e reação em cadeia da polimerase (qPCR)

Para a realização da transcrição reversa foram utilizados 2 µg do RNA total para cada reação com um volume final de 20 µL. Para a realização da transcrição reversa foi necessário preparar um mix em um microtubo, o mix continha 2µL de tampão 10x RT buffer, 0,8 µL de dNTP mix (100mM), 2 µL de random primer 10x, 1 µL da solução contendo a enzima transcriptase reversa, 1 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água livre de nuclease. Logo após a adição dos componentes do mix nos microtubos, os mesmos foram levados ao vórtex para homogeneização. Em outros microtubos foram colocados 10µL do mix anteriormente preparado + 10 µL de cada amostra. Em seguida, os microtubos foram colocados no termociclador sendo submetidos a um ciclo de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos encerrando o ciclo a uma temperatura de 4°C. O DNA complementar formado pode ficar a 4°C por no máximo 24h ou estocado - 20 °C a longo prazo.

O sistema de amplificação *SYBR green* foi utilizado na qPCR e os alvos para a amplificação foram as regiões gênicas e específicas para *S. mansoni* que codificam as enzimas SmATPDase 1 e SmATPDase 2. A sequência dos primers utilizadas no estudo podem ser vistas na tabela a seguir, e foram também utilizados por Da'dara, Bhardwaj e Skelly (2014).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na qPCR.

Gene	Primers	Sequência
SmATPDase 1	SmATPDase 1 -F	5'-CTGATGCCGTTATG AAGTTTTGCA-3
	SmATPDase 1 -R	5'-GCAGTAAA CCCTTGGTCAGATAATTTTG-3',
SmATPDase 2	SmATPDase 2 -F	5' GGTTATGGATTCCCGGCAGATA 3'
	SmATPDase 2 -R	5'-TGAAAATAAGGCACCAAGACTCCAA-3'

Inicialmente o mix foi preparado adicionando-se a um microtubo 7,5 µL de SYBR green, 0,6 µL do par de primers a 10µM e 4,9 µL de água DEPC. Desse mix foram retirados. 13 µL os quais foram adicionados a 2 µL de cada amostra de cDNA em placas de 96 poços. Em seguida, as placas foram levadas para o termociclador (ABI 7500, Applied Biosystems) para a amplificação. O monitoramento da amplificação ocorreu com por meio do programa 7500 Software v2.0.6. O ciclo conduzido pelo termociclador iniciou-se com uma temperatura a 50°C por 2 minutos passando para uma temperatura de 95°C por 10 minutos. Para a amplificação ocorreram 40 ciclos nos quais as temperaturas ficam por 15 segundos a 95°C e por 1 minuto a 60°C. Para identificação da *melt curve* as temperaturas variaram da seguinte forma: 95°C por 15 segundos, 60°C 1 minuto, aquecida a 1%, elevada por 30 segundos a 95°C e por fim reduzida a 60°C por 15 segundos. Para a quantificação das amostras foram utilizados os valores de Ct utilizando o gene controle como referência.

4.8 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

4.8.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PMBC)

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi necessário coletar 20 mL de sangue periférico dos participantes. A coleta foi realizada a vácuo utilizando-se tubos contendo heparina sódica como anticoagulante (Vacutainer®, Becton Dickinson, EUA). A separação das células foi realizada segundo o procedimento descrito por GAZZINELLI et al. (1983).

O sangue foi diluído na proporção de 1:1 em PBS diluída 1:10, seguida da homogeneização. Em tubos de polipropileno de 50 mL, foram adicionados 10 mL de Ficoll-hipaque. Logo após, 20 mL do sangue diluído foi lentamente adicionado nas paredes dos tubos, de modo a evitar a mistura do sangue com o ficoll. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 900G (2000rpm), durante 30 minutos, a 25° C (Model j-6b Centrifuge, Beckman). Após a centrifugação, foi observado em todos os tubos a formação de um anel de células mononucleares na interface entre o ficoll e o plasma. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur o anel de células mononucleares foi coletado e adicionados em tubos cônicos de polipropileno de 50 ml (Falcon).

A próxima etapa consistia na lavagem das células que foram lavadas 2 vezes. Na primeira lavagem, as células foram diluídas 1:1 em PBS 1x e centrifugadas a 10 minutos, 4°C, 1800rpm. Na segunda, foi acrescentado 20ml de PBS 1X sobre o pellet de células formado, homogeneizou e centrifugou por 10 minutos, 4°C, 1500rpm. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em meio RPMI 1640 (GIBCO) acrescido de 5% 32 de soro humano AB+ (SIGMA), 3% de antibiótico-antimicótico (solução estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000 µg de estreptomicina e 25µg de fungizona por mililitro, GIBCO BRL) e 1,6% de L-glutamina (Solução estoque: 200Mm, GIBCO, Grand Island, NY, USA) - meio denominado CMBLAST – para a posterior contagem das células e cálculos para o plaqueamento. Para a determinação do número de células foi realizada a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico, a partir de uma alíquota de células diluída em solução de Turck (1:20). A concentração final foi ajustada com CMBLAST para 1×10^7 células/mL. Toda a manipulação foi realizada em condições

assépticas e em capela de fluxo laminar (BBL-Biological Cabinet, model 60474, Cocheysville, MD).

4.8.2 Obtenção de sobrenadante de cultura de PBMC

1,0 x 10⁶ células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) acrescido de 5% de soro humano AB+ (SIGMA), 3% de antibiótico-antimicótico (solução estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000 µg de estreptomicina e 25µg de fungizona por mililitro, GIBCO BRL) e 1,6% de L-glutamina (Solução estoque: 200Mm, GIBCO, Grand Island, NY, USA) e foram cultivadas em placas de 96 poços (Falcon, BD) por 72 horas após estímulo com antígeno solúvel do ovo de *S.mansoni* (SEA) em incubadora contendo 5% de CO₂ (Forma Scientific, Marietta, OH, USA), em atmosfera úmida.

As células de cada indivíduo foram depositadas em quatro poços consecutivos e identificados da placa. Os experimentos foram realizados em duplicata de modo que em dois poços as células não foram estimuladas com SEA, ou seja, eram os controles e nos outros dois as células do mesmo indivíduo foram estimuladas com SEA. Além disso, células de um dos indivíduos foram estimuladas com PHA, em triplicata, para o controle positivo do ensaio.

4.8.3 Medida de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC

Os níveis de citocinas Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, Fator de necrose tumoral (TNF-α) e Interferon-γ (IFN-γ) nos sobrenadantes das culturas de PBMC foram quantificados através de citometria de fluxo, utilizando-se o ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes (Human Cytokine CBA Kit Th1, Th2, Th17 -Becton Dickinson-BD). A metodologia CBA – BD permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, utilizando pequenos volumes de amostra.

Os sobrenadantes de cultura foram descongelados em banho Maria a 37°C e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Foram preparadas alíquotas de padrões em diluições seriadas com o tampão diluente fornecido pelo fabricante do Kit (diluente G) nas concentrações de 5000 pg/ml (1:1 – Top Standard), 2500 pg/ml (1:2), 1250 pg/ml (1:4), 625 pg/ml (1:8), 312,5 pg/ml (1:16), 156 pg/ml (1:32), 80 pg/ml (1:64), 40 pg/ml (1:128) e 20 pg/ml (1:256). Quinze microlitros da mistura de beads de captura, conjugadas com anticorpos

monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ (Human Cytokine CBA Kit Th1, Th2, Th17) foram adicionados tubos de poliestireno de 5 ml. Em seguida, foram adicionados 25 μ l das amostras, dos padrões e do diluente, que nesse caso, foi usado com tubo controle da reação. Adicionou-se, também, 18 μ l do conjugado marcado com ficoeritrina (PE - FL-2) a cada tubo de reação, sendo estes homogeneizados por 30 segundos cada tubo. Os tubos foram incubados por 180 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a segunda incubação, as amostras foram lavadas com 500 μ l de tampão de lavagem (Wash 34 Buffer), centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos a 18°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo (FANEM®, Brasil), deixando-se um volume de aproximadamente 200 μ l/tubo. Foi realizada a leitura no citômetro BD FACSVerse™.

Os resultados para todos os testes foram registrados utilizando como unidades de medida tanto picograma por mililitros (pg/mL) quando a intensidade média de fluorescência (MFI). Posteriormente, o Índice de Citocinas foi calculado.

4.9 Análise estatística

Os dados do estudo foram analisados pelos programas Excel e Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) as diferenças foram consideradas significativas ao nível de α 0,05. As análises foram feitas através de Teste T de Student e Razão de chances.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da população de estudo:

A população de estudo envolveu 64 indivíduos infectados e 33 indivíduos não infectados por *S. mansoni*, destes, 19 eram residentes em área endêmica (CE) e 14 residiam em regiões não endêmicas do município de Governador Valadares (CNE). As informações referentes a idade, sexo, intensidade de infecção e reinfeção podem ser visualizadas na Tabela 2. Entre os 64 indivíduos infectados com *S. mansoni*, 38 (59,4%) eram do sexo masculino e 26 (40,6%) do sexo feminino. Esse dado corrobora outros achados na literatura que associam uma maior taxa de infecção a indivíduos do sexo masculino (KABATEREINE et al., 2004; ROLLEMBERG et al., 2015; ENK et al., 2010; DAWAKI et al., 2016; OLVEDA et al., 2017), uma vez que fatores comportamentais ligados ao sexo masculino, como atividades de lazer próximas ao rio, valas e valetas, pesca e banho, além de atividades laborais como agricultura e corte de capim, podem justificar tais observações, enquanto as mulheres, na maioria das vezes, exercem atividades geralmente domésticas (KABATEREINE et al., 2004).

A idade dos indivíduos infectados variou de 9 a 79 anos com a média de idade de $33,84 \pm 18,43$ anos e mediana de 29 anos. Quando a idade foi categorizada em faixas etárias de 0 a 19 anos, 20 a 60 anos e > 60 anos, foi observado que 16 (25 %) indivíduos possuíam até 19 anos, 39 (60,9 %) tinham entre 20 a 60 anos e 9 (14,1%) mais de 60 anos. Assim, observamos uma prevalência maior da infecção em indivíduos com idade intermediária (20 a 60 anos). Dados da literatura indicam que a infecção pelo *S. mansoni* acomete com mais frequência indivíduos jovens, em um estudo realizado por Neto et al. (2012) foi observado uma predominância de infecção na faixa etária de 10 a 29 anos. Um outro estudo realizado por Olveda et al. (2017) nas Filipinas, observou a ocorrência da esquistossomose na faixa etária de 36 a 55 anos. Esses estudos atribuem essa característica a hábitos de vida dos indivíduos em especial a atividade laboral.

Em relação a intensidade de infecção na população estudada, foi observada uma variação de 0 a 648 ovos por grama de fezes (OPG); média de $56,44 \pm 121,8$; mediana 12 OPG; intervalo interquartil: 1- 45 OPG. Dos indivíduos infectados, 50 (78,1%) apresentaram níveis de infecção inferior a 50 OPG, 5 (7,8 %) apresentaram entre 50 e 100 OPG e 9 (14,1 %) apresentaram mais de 100 OPG. Esses resultados mostram que a grande parte dos indivíduos infectados pelo *S.mansoni* residentes em Xonin de Baixo apresentam uma baixa carga parasitária. A diminuição

da prevalência no distrito de Xonin foi observada em nosso estudo, uma vez que observamos uma prevalência da doença inferior a 10%, com a maioria dos indivíduos eliminando menos de 96 OPG de fezes. Dias et al. 1994 descreveram que esses parâmetros caracterizam uma área de baixa endemicidade para a esquistossomose. Em 2010, Azeredo et al. caracterizaram o distrito de Xonin de Baixo como uma área de média endemicidade, onde a prevalência deve ser maior que 10% e a maioria dos indivíduos devem eliminar mais de 120 opg de fezes. Em 2012, Neto et al., realizaram um estudo em Natuba, distrito do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, e observaram, assim como em nosso estudo, uma carga parasitária média, 60,2 ovos por grama de fezes, nos indivíduos infectados. Dados da literatura mostram que a falta de saneamento básico, a ausência de água tratada para o consumo e o contato constante com águas naturais (REY, 1999) são fatores imprescindíveis para a transmissão da esquistossomose mansoni (ROUQUAVROL; ALMEIDA FILHO, 2003). Têm sido observados nas regiões endêmicas uma baixa carga parasitária, que pode ser explicada pelo emprego do tratamento coletivo. Um estudo realizado no Quênia por Lelo et al. (2014) com crianças em idade escolar, demonstrou que o tratamento coletivo diminuiu a prevalência e as formas graves da esquistossomose, entretanto, o parasita continuou viável na região podendo causar reinfecções. Outro estudo realizado em Pernambuco, Brasil, demonstrou que o tratamento coletivo foi capaz de reduzir a carga parasitária presente nos indivíduos infectados, mas, não foi capaz de erradicar o parasita na região (GOMES et al., 2016).

Sabe-se, entretanto, que a fêmea do parasito não realiza a postura dos ovos diariamente (SCOTT, 1938; MARTINS, 1949; KLOETZEL, 1962) e o método de Kato-Katz utilizado no diagnóstico da doença é pouco sensível em áreas de baixa endemicidade, como é o caso do distrito de Xonin. O teste de Kato-Katz tem sido utilizado durante 40 anos na redução das taxas de prevalência mundial, no entanto, a principal desvantagem do método é a sua insensibilidade crescente para diagnosticar em áreas contendo indivíduos com intensidade de infecção "moderada" (100-399 OPG) e baixa (<100 OPG). A técnica de Kato Katz é tida como "padrão ouro" para o diagnóstico de esquistossomose, porém sua sensibilidade pode chegar a 25% em regiões com pouca transmissão da doença (KATO; MIURA, 1954; KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972; LEWERT; YOGORE; BLAS, 1984; WHO, 1998; TCHUEM TCHUENTE, 2011).

Em geral, as reinfecções em áreas endêmicas são constantes e aumentam até os vinte anos de idade, diminuindo progressivamente a partir da segunda década de vida. Em nosso trabalho, foi observado que 27 (42,2%) indivíduos não haviam sido infectados anteriormente, enquanto 28 (43,8%) indivíduos afirmaram já terem sido infectados, caracterizando no

momento do estudo, uma reinfecção. Ao dividir os indivíduos reinfectedos quanto a carga parasitária, observa-se que 1 indivíduo apresentou > 100 OPG e 27 apresentaram < 100 OPG. Assim, foi observada uma relação significativa ($p = 0,0468$) entre os indivíduos que possuíam < 100 OPG e a reinfecção. Black et. al (2010) demonstraram que indivíduos que vivem em área endêmica e possuem baixa carga parasitária podem desenvolver uma imunidade adquirida, caracterizada por uma resposta do tipo 2 que é montada em frente a alta frequência de exposição aos antígenos do parasita, que propicia uma menor chance de serem reinfectedos. Outro estudo realizado com crianças e adolescentes escolares residentes no Vale de Jequitinhonha, MG, demonstrou que as crianças e adolescentes que tinham alta carga parasitária antes do tratamento tinham mais risco de se reinfectedarem quando comparado aos participantes de baixa carga parasitária (LIMA, 2015). Na literatura existe um consenso de que, embora ocorra uma pequena redução nos níveis de exposição dos indivíduos com a idade, ela é insuficiente para explicar a grande redução na intensidade de reinfecção, cuja causa foi atribuída ao desenvolvimento de uma resistência adquirida com a idade. A reinfecção é um fator importante para a manutenção da doença principalmente em áreas endêmicas onde os indivíduos apesar de receberem tratamento adequado e serem orientados quanto às formas de transmissão da doença, continuam com os mesmos hábitos de vida, frequentando córregos e valas para atividades de lazer, trabalho e uso doméstico, o que acaba por facilitar o processo de reinfecção (DAWAKI et al., 2016).

No grupo de indivíduos não infectados residentes em área endêmica (CE), 11 (57,9 %) eram do sexo masculino e 8 (42,1%) do sexo feminino. Uma proporção semelhante foi observada no grupo de indivíduos não infectados e não residentes em área endêmica (CNE), nos quais 8 (57,2 %) eram pertencentes ao sexo masculino e 6 (42,8%) ao sexo feminino. Com relação a idade, no grupo CE a mesma variou entre 9 a 77 anos, com uma média de $46,58 \pm 20,16$ anos, mediana de 51 anos e intervalo interquartil de 28 a 59 anos. A maioria dos indivíduos (78,94 %) tinham entre 20 a 60 anos, 3 (57,9 %) eram maiores de 60 anos e apenas 1 (5,26%) possuía entre 0 a 19 anos. No grupo CNE, a idade variou entre 14 a 76 anos com uma média de $36,07 \pm 20,74$ anos, mediana de 29 anos, e intervalo interquartil de 21 a 50,75 anos. Neste grupo de indivíduos, 2 (14,3%) tinham entre 0 a 19 anos, 9 (64,3%) entre 20 e 60 anos e 3 (21,4%) possuíam mais de 60 anos.

Sendo assim, percebe-se que a maioria dos indivíduos infectados avaliados em nosso estudo pertencem ao sexo masculino, possuem idade que varia de 20 a 60 anos e apresentam uma baixa carga parasitária (< 50 OPG). Além disso, os resultados sugerem que a reinfecção pode ser um fator importante para manter a carga parasitária menor que 100 OPG.

Tabela 2 – Caracterização da população de estudo.

Parâmetros	Positivos (n = 64)	CE (n = 19)	CNE (n= 14)
Idade (anos)			
• Variação	(9 – 79 anos)	(9 – 77 anos)	(14 – 76 anos)
• Média ± SD	33,84 ± 18,43	46,58 ± 20,16	36,07 ± 20,74
• Mediana	29	51	29
• Intervalo interquartil (25 -75%)	19 - 47	28 - 59	21 – 50,75
Faixa etária (anos)			
0 – 19	16 (25%)	1 (5,26%)	2 (14,3%)
20 – 60	39 (60,9)	15 (78,94%)	9 (64,3%)
>60	9 (14,1%)	3 (15,78%)	3 (21,4%)
Sexo			
Feminino	26 (40,6%)	8 (42,1%)	6 (42,8%)
Masculino	38 (59,4%)	11 (57,9%)	8 (57,2%)
Infecção			
Primo-infecção	27 (42,2%)	-	-
Reinfecção	28 (43,8%)	-	-
Intensidade de infecção (OPG*)			
• Variação	(0 – 648 OPG)		
• Média ± SD	56,44 ± 121,8		
• Mediana	12	-	-
• Intervalo interquartil (25 - 75%)	1- 45		
Distribuição de ovos (OPG*)			
< 50	50 (78,1%)	-	-
50 – 100	5 (7,8%)	-	-
> 100	9 (14,1)	-	-

* OPG – ovos por grama de fezes

Fonte: dados da pesquisa.

5.2 Avaliação da ecogenicidade periportal

A avaliação dos órgãos residentes na região abdominal, especialmente fígado e baço, é extremamente importante uma vez que alterações morfológicas e funcionais podem acometê-los em caso de infecção pelo *S. mansoni*, especialmente nas formas mais graves da doença. Nesse sentido, foi realizada a avaliação ultrassonográfica de todos os indivíduos participantes do estudo.

Não foram observadas alterações no exame ultrassonográfico no grupo de indivíduos controle residentes em área endêmica (n = 19) e no grupo de indivíduos controle residentes em área não endêmica (n = 14).

Dos 64 indivíduos infectados com *S. mansoni*, 5 (7,8%) apresentaram alteração no espessamento da parede dos ramos periportais, com variação entre 3-5mm, caracterizando o desenvolvimento de uma fibrose periportal incipiente de acordo com a OMS. Um estudo realizado na cidade de Bananal em São Paulo, a qual é uma área de baixa endemicidade para a esquistossomose, também encontrou uma baixa incidência de fibrose periportal central e periférica (4,6%) (ESPIRITO SANTO et al., 2008). Entretanto, a incidência da fibrose hepática na esquistossomose pode variar dependendo da localidade estudada. Em regiões de maior endemicidade encontra-se alterações no exame ultrassonográfico mais significativas. Em um estudo realizado na zona rural de Alexandria no Egito, 33,3% dos participantes apresentaram diâmetro veia porta > 13 mm, 26,2% fibrose periportal grau 2 (> 5 mm), e 28,6% esplenomegalia, diferindo portanto, dos nossos achados (ZAKI et al., 2003). Outro trabalho realizado no estado de Pernambuco mostra dados ainda mais alarmantes, eles demonstraram que entre 1999 a 2013 foram registrados 2578 óbitos por esquistossomose e que entre 2008 e 2014 foram registradas 473 internações por esta doença. Entre 1999 e 2014 foram identificados 1943 casos de esquistossomose tratados no Hospital das Clínicas de Pernambuco, sendo que 1411 (72,6%) dos indivíduos apresentaram a forma hepatoesplênica (HE) e entre os casos de HE, 58 (4,6%) indivíduos tiveram ascite, 556 (43,2%) apresentaram sangramento gastrointestinal superior e 489 (39,1%) tiveram circulação colateral. O padrão de fibrose no fígado avançada e muito avançada ocorreu em 793 (65,5%) dos casos (BARBOSA et al., 2016).

Os 64 indivíduos positivos foram classificados quanto a presença de alteração no espessamento da parede dos ramos periportais, e assim caracterizados quanto a idade, sexo e distribuição de ovos. Os dados podem ser vistos na Tabela 3. Entre os indivíduos que apresentaram espessamento da parede dos ramos periportais, 4 (80 %) eram pertencentes ao

sexo masculino e 1 (20%) ao sexo feminino. A idade desses indivíduos variou entre 27 a 66 anos, com média de $46,2 \pm 17,57$ anos, mediana de 50 anos e intervalo interquartil de 28 a 62,5 anos. Nenhum dos indivíduos possuíam entre 0 a 19 anos, 4 (80%) tinham entre 20 a 60 anos e 1 (20%) possuía idade superior a 60 anos. Estudos realizados no Senegal encontraram uma prevalência de fibrose hepática de 6% em indivíduos de 0 a 9 anos e de 44% naqueles maiores que 20 anos de idade. Esses estudos mostraram também que as formas mais graves de fibrose hepática só é aparente em adultos com mais de 20 anos de idade, deixando claro que a idade se apresenta como um fator de risco para o desenvolvimento dessa morbidade. Além disso, observaram uma maior prevalência da fibrose em homens quando comparado as mulheres (MEURS et al., 2012, GRYSEELS et al., 2006). Contudo, estudo realizado no Hospital das Clínicas de Pernambuco encontrou uma maior incidência de casos hepatoesplênicos durante a infecção pelo *S. mansoni* em mulheres, o que pode estar associado ao fato de que a população amostral do estudo tinha uma proporção maior de mulheres. Nesse mesmo estudo, a faixa etária predominante de alterações hepatoesplênicas foi de 30 a 59 anos, correlacionando-se com os nossos achados (BARBOSA et al., 2016).

Nos indivíduos infectados, mas sem alteração no espessamento da parede dos ramos periportais (n=59), 34 (57,6%) eram pertencentes ao sexo masculino e 25 (42,4%) ao sexo feminino. Foi observado que a idade neste grupo, variou entre 9 a 79 anos com a média de $32,78 \pm 18,10$ anos, mediana de 28 anos e intervalo interquartil de 18 a 45 anos. Quinze (25,42%) indivíduos possuíam entre 0 a 19 anos, 35 (59,32%) entre 20 a 60 anos e 9 (15,25%) tinham mais de 60 anos.

Tabela 3 – Caracterização dos indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal.

Parâmetros	Com alteração (ECO +) (n = 5)	Sem alteração (ECO -) (n = 59)
Idade (anos)		
• Variação	(27 - 66 anos)	(9 - 79 anos)
• Média \pm SD	46,2 \pm 17,57	32,78 \pm 18,10
• Mediana	50	28
• Intervalo interquartil (25 - 75%)	28 - 62.5	18 - 45
Faixa etária (anos)		
0 - 19	0 (0%)	15 (25,42%)
20 - 60	4 (80%)	35 (59,32%)
> 60	1 (20%)	9 (15,25%)
Sexo		
Feminino	1 (20 %)	25 (42,4%)
Masculino	4 (80 %)	34 (57,6%)
Distribuição de ovos (OPG)		
< 50	5 (100%)	45 (76,3%)
50 - 100	0 (0 %)	5 (8,5%)
>100	0 (0 %)	9 (15,2%)

*(OPG): Ovos por grama de fezes.

* (ECO +): Espessamento da parede dos ramos periportais entre 3-5 mm.

* (ECO -): Espessamento da parede dos ramos periportais menor que 3 mm.

Fonte: dados da pesquisa.

5.3 Expressão de SmATPDase 1 e SmATPDase 2 em amostras fecais de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

A avaliação molecular das amostras de fezes coletadas dos 64 indivíduos infectados foi realizada a fim de identificar a expressão gênica das enzimas SmATPDase 1 e SmATPDase 2 através da técnica de RT-PCR. A tabela 4 demonstra que a expressão de pelo menos uma das ectonucleotidases (SmATPDase +) foi detectada em amostras de fezes de 33 (51,6%) indivíduos infectados pelo *S.mansoni*. Desse total, 5 (15,2%) expressavam apenas a enzima SmATPDase 1, 11 (33,3%) expressavam apenas SmATPDase 2 e os outros 17 (51,5%)

indivíduos expressavam tanto SmATPDase 1 quanto SmATPDase 2. É interessante destacar que entre os indivíduos com fibrose (n = 5), 80% (n = 4) demonstraram expressão de SmATPDases em suas amostras de fezes. O aumento de adenosina gerado pela ação catalítica das enzimas poderia favorecer o desenvolvimento de fibrose. Alguns estudos demonstraram que a adenosina ao atuar em receptores A_{2A} em células estreladas hepáticas é capaz de aumentar a produção de colágeno I e III estimulando o desenvolvimento de fibrose hepática (CHAN et al., 2006; HASHMI et al., 2007). Não foi possível identificar expressão das SmATPDase 1 e/ou SmATPDase 2 em amostras fecais de 31 (48,4%) indivíduos (SmATPDase -).

Diversos autores demonstram a presença dessas enzimas no verme e em ovos retirados do fígado de camundongos infectados por *S. mansoni*. (VASCONCELOS et al., 1993; DEMARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2006; LEVANO-GARCIA et al., 2006; FARIA-PINTO et al., 2010; MENDES et al., 2011; Da Dara et al., 2014). A presença de enzimas envolvidas com o metabolismo de ATP extracelular já foi descrita para diferentes parasitos e tem sido correlacionada com a virulência dos mesmos e com o desenvolvimento da fibrose cística e da asma (ESTHER Jr et al., 2008). Entretanto ainda não é possível encontrar na literatura atual, trabalhos que propõem avaliar a presença dessas enzimas em ovos do verme coletados em amostras fecais de seres humanos, o que justifica a relevância desse estudo.

Da'dara et al. (2014) demonstrou que a SmATPDase 1 é mais expressa nos esquistossômulos e em fêmeas adultas do que nas cercarias e machos adultos, e que a isoforma da SmATPDase 2 é mais encontrada nos ovos do parasita quando comparado a outras formas evolutivas. Além disso, um outro estudo realizado por Levano- Garcia et al. (2006) revelou que a SmATPDase 1 é encontrada na borda do tegumento, enquanto que a SmATPDase 2 está localizada na parte mais interna do tegumento, podendo ser secretada.

O nosso trabalho é inovador no sentido de ser o primeiro a avaliar a expressão dessas enzimas em ovos do parasito obtidos de fezes humanas. Dessa forma, não é possível comparar os nossos resultados com a literatura, uma vez que os dados da literatura disponíveis são utilizando ovos obtidos de camundongos infectados (LEVANO- GARCIA et al., 2006; D'ARA et al., 2014; MARCONATO et al., 2017).

Tabela 4 – Expressão de SmATPDases em amostras fecais de indivíduos infectados com *S. mansoni*.

Expressão de SmATPDases	n (%)	n (%)
SmATPDase -	31 (48,4)	-
SmATPDase +	33 (51,6)	SmATPDase 1 5 (7,8) SmATPDase 2 11 (17,2) SmATPDase 1 e SmATPDase 2 17 (26,6)
Total	64 (100,0)	

Fonte: dados da pesquisa.

5.4 Perfil de citocinas de indivíduos infectados residentes em área endêmica

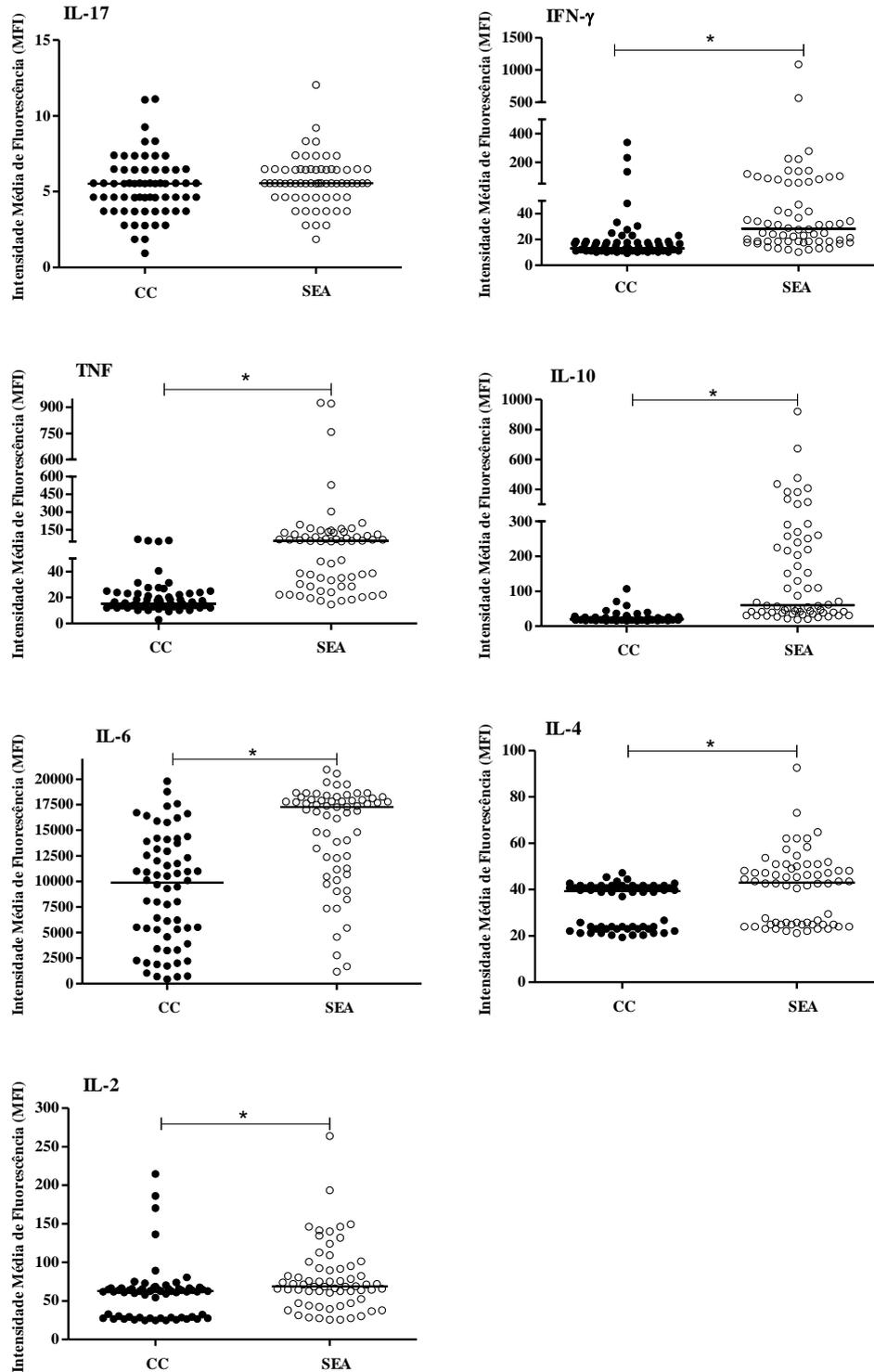
A avaliação imunológica foi realizada afim de compreender a ação do sistema imunológico durante a infecção causada pelo *S. mansoni*. Além disso, buscou-se identificar os perfis imunológicos que pudessem estar atrelados a fatores como a alteração da ecogenicidade periportal, expressão de ectonucleotidases, carga parasitária e fatores individuais como idade e sexo.

Os grupos utilizados para esta análise foram anteriormente citados, e compreendem: grupo positivo (n= 64) composto por indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e residentes em área endêmica; e dois grupos controles compostos por indivíduos que não possuíam a infecção. Um grupo controle constituído de indivíduos residentes em área endêmica (CE; n= 19) e o outro grupo contendo indivíduos que não residem em área endêmica (CNE; n= 14).

Antes da realização de qualquer análise buscou-se comprovar a eficácia da estimulação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de todos os participantes do estudo frente ao antígeno solúvel do ovo do parasito (SEA). Para os indivíduos do grupo positivo foi observado que o estímulo de PBMC com SEA aumentou os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante de cultura comparado as PBMC não estimuladas (CC) (Figura 2). Nas culturas de PBMC dos indivíduos não infectados e não residentes em área endêmica, o estímulo com SEA aumentou a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 (Figura 3). De modo semelhante foi observado nas culturas de PBMC dos indivíduos não infectados residentes em área endêmica que o estímulo com SEA aumentou a produção de IFN- γ , TNF- α ,

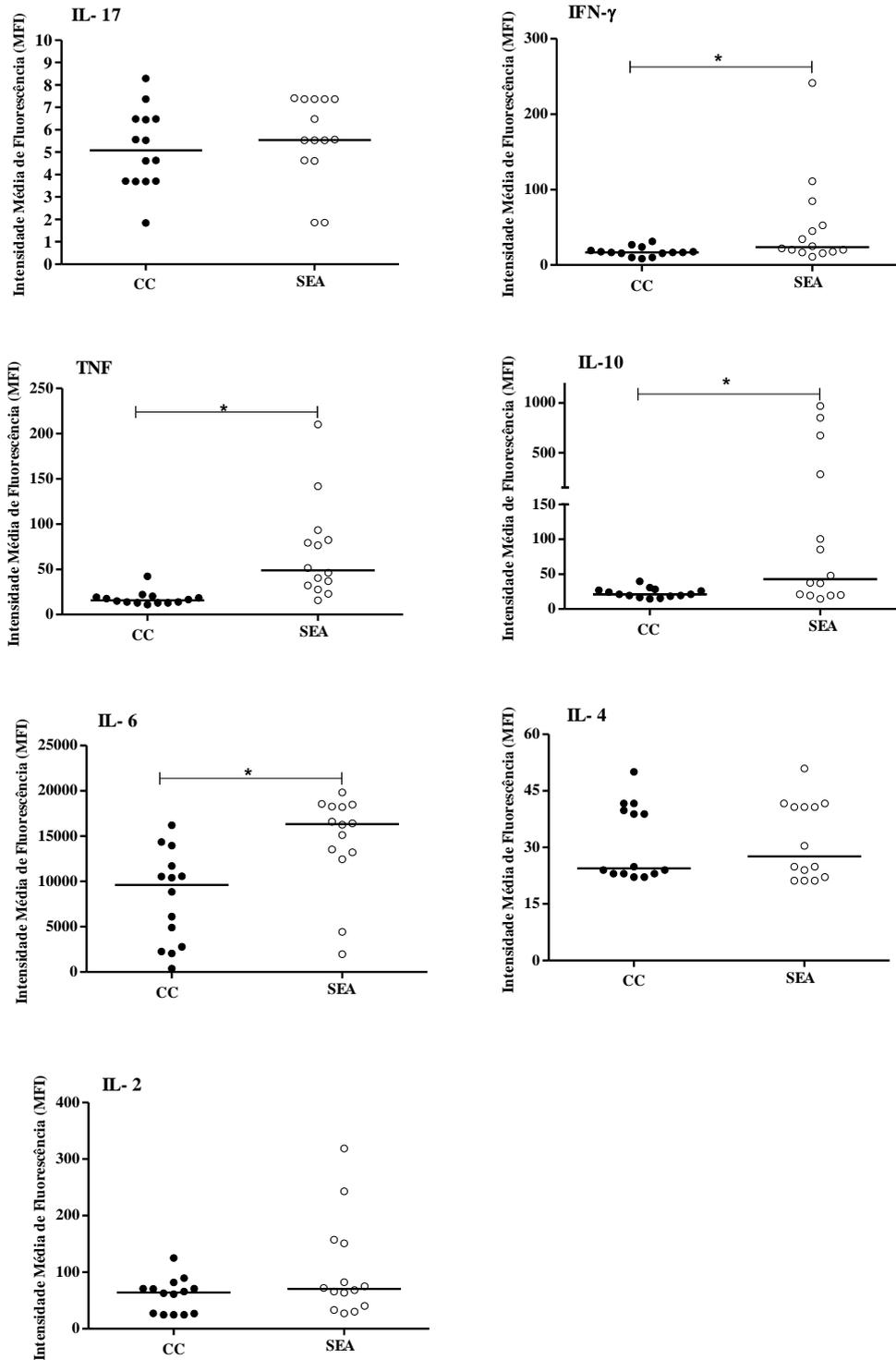
IL-10 e IL-2 (Figura 4). Por fim, ao unir os dois grupos de indivíduos não infectados foi observado aumento significativo na produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-2 após o estímulo de PBMC com SEA (Figura 5). Todos esses resultados demonstram que a presença do antígeno do ovo (SEA) pode provocar alterações imunológicas significativas mostrando uma sensibilidade das células mononucleares do sangue periférico ao antígeno utilizado.

Figura 2 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 na população de indivíduos infectados por *S. mansoni*. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes recolhidos de culturas de PBMC estimuladas com SEA por citometria de fluxo. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com SEA (SEA) ou não foram estimuladas (CC) e a produção de citocinas no sobrenadante foi comparada. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



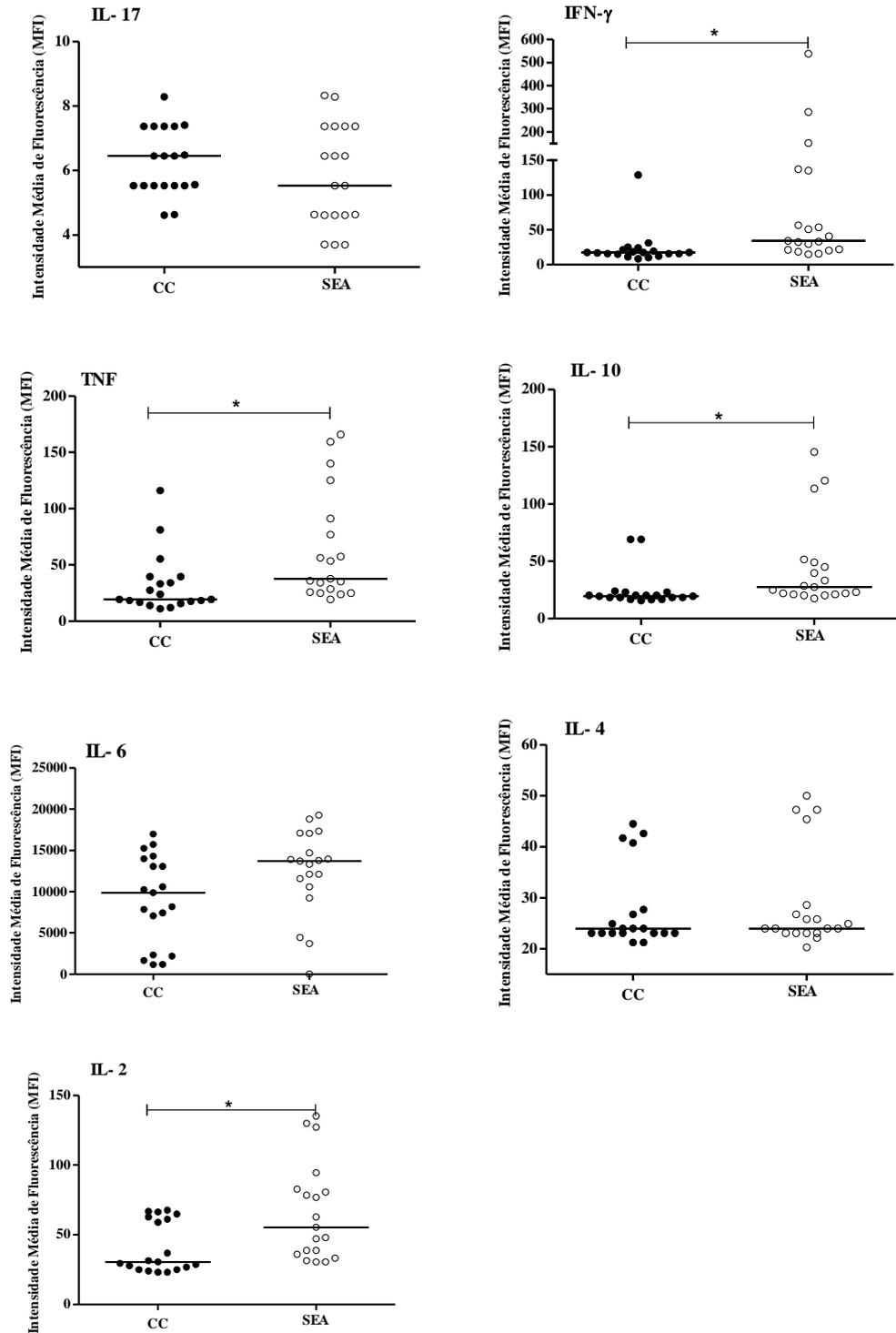
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 3 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 na população de indivíduos não infectados por *S. mansoni* e residentes em área não endêmica. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes recolhidos de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com SEA (SEA) ou não foram estimuladas (CC) e a produção de citocinas no sobrenadante foi comparada. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



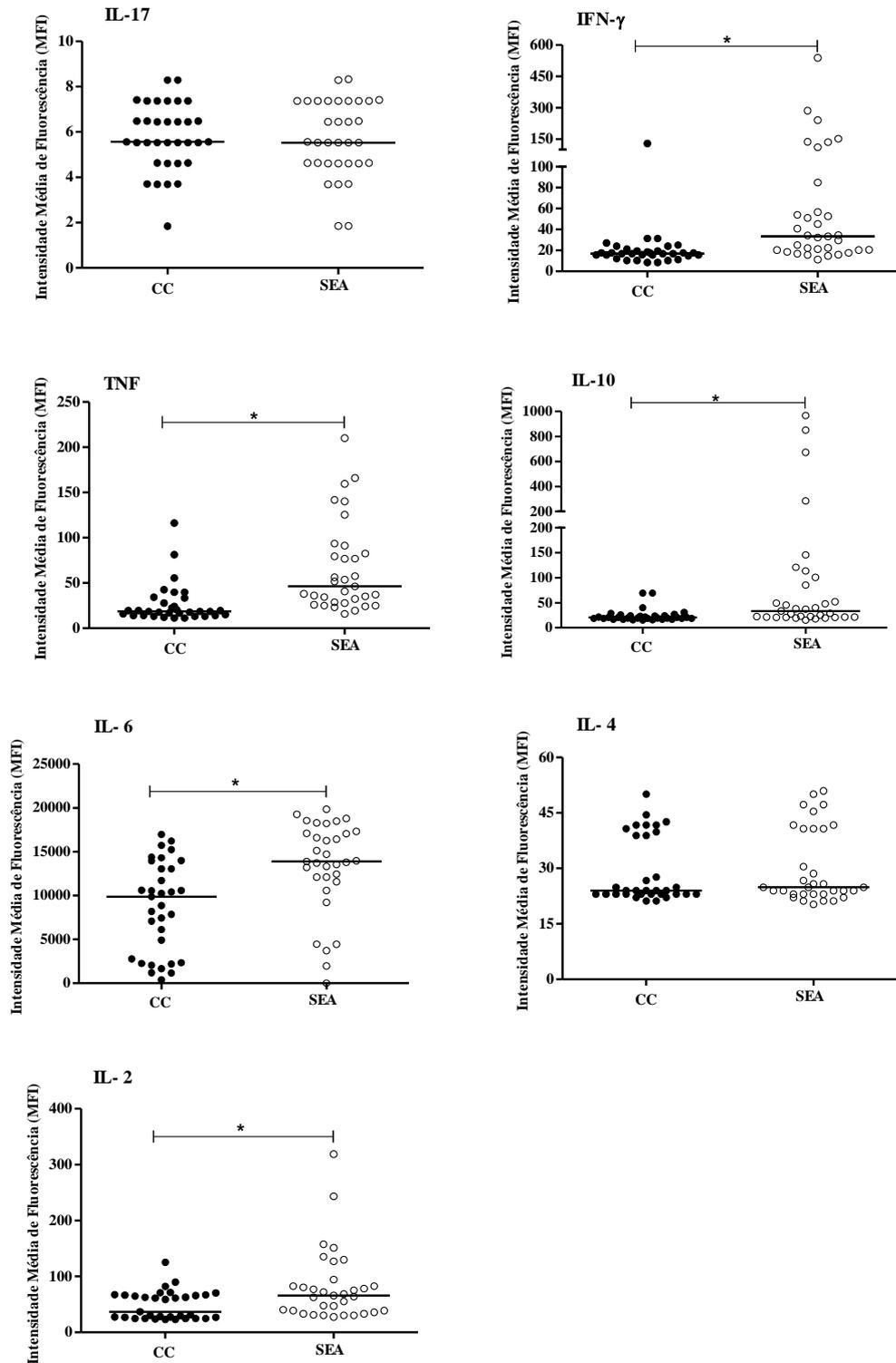
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 4 – A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-2 na população de indivíduos não infectados por *S. mansoni* residentes em área endêmica. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes recolhidos de culturas de PBMC estimuladas com SEA por citometria de fluxo. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com SEA (SEA) ou não foram estimuladas (CC) e a produção de citocinas no sobrenadante foi comparada. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 5 - A estimulação com SEA aumenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-2 na população de indivíduos não infectados por *S. mansoni*. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes recolhidos de culturas de PBMC estimuladas com SEA por citometria de fluxo. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com SEA (SEA) ou não foram estimuladas (CC) e a produção de citocinas no sobrenadante foi comparada. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



Fonte: dados da pesquisa.

Uma vez constatado que o estímulo com SEA alterou o perfil imunológico das células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos, utilizou-se o índice de citocinas (SEA/CC) para verificar as alterações quantitativas na produção de citocinas pelas PBMC obtidas dos indivíduos participantes do estudo. O índice de citocinas é um parâmetro que pode ser obtido por meio da razão entre os valores de intensidade média de fluorescência (MFI) referente à quantidade de citocinas encontradas em poços estimulados com SEA pelos valores de MFI identificado nos poços sem estímulo. Essa forma de avaliação tem sido utilizada na literatura, Luisa-silva et al. (2011) mostrou que o índice de citocinas é uma medida que avalia de forma interessante e eficiente os níveis de citocinas produzidos em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico.

Inicialmente, buscou-se identificar e quantificar as citocinas produzidas pelos grupos em estudo. Ao comparar a produção de citocinas entre os três grupos, observou-se que os indivíduos infectados pertencentes ao grupo positivo (POS) produzem maior quantidade de IL-4 quando comparados aos indivíduos não infectados (CE e CNE) e IL-10 quando comparados aos indivíduos não infectados residentes em área endêmica (CE). Além disso, foi possível observar uma menor produção de IL-2 no grupo positivo de área endêmica quando comparado aos indivíduos do grupo CE (Figura 6).

É importante salientar que a resposta imunológica montada contra o *Schistosoma mansoni* pode diferir entre os indivíduos infectados, originando as diferentes manifestações clínicas e complicações patológicas. Diversos fatores podem estar associados a heterogeneidade da resposta imunológica, como diferentes padrões de exposição, intensidade de tratamento, reinfeção, entre outros. Já é descrito na literatura que nas duas a três semanas iniciais da infecção a resposta imunológica predominante nos indivíduos infectados é do tipo Th1. A medida que os parasitas se tornam adultos, acasalam e produzem ovos, a resposta imunológica vai se tornando do tipo Th2 com o predomínio de citocinas IL-4 e IL-5. A mudança do tipo de resposta é decorrente do estímulo provocado pelos antígenos dos ovos. Na fase crônica da doença, observa-se que a resposta do tipo Th2 predominante é modulada de tal maneira que os granulomas vão se formando ao redor dos ovos (PEARCE; MACDONALD, 2002).

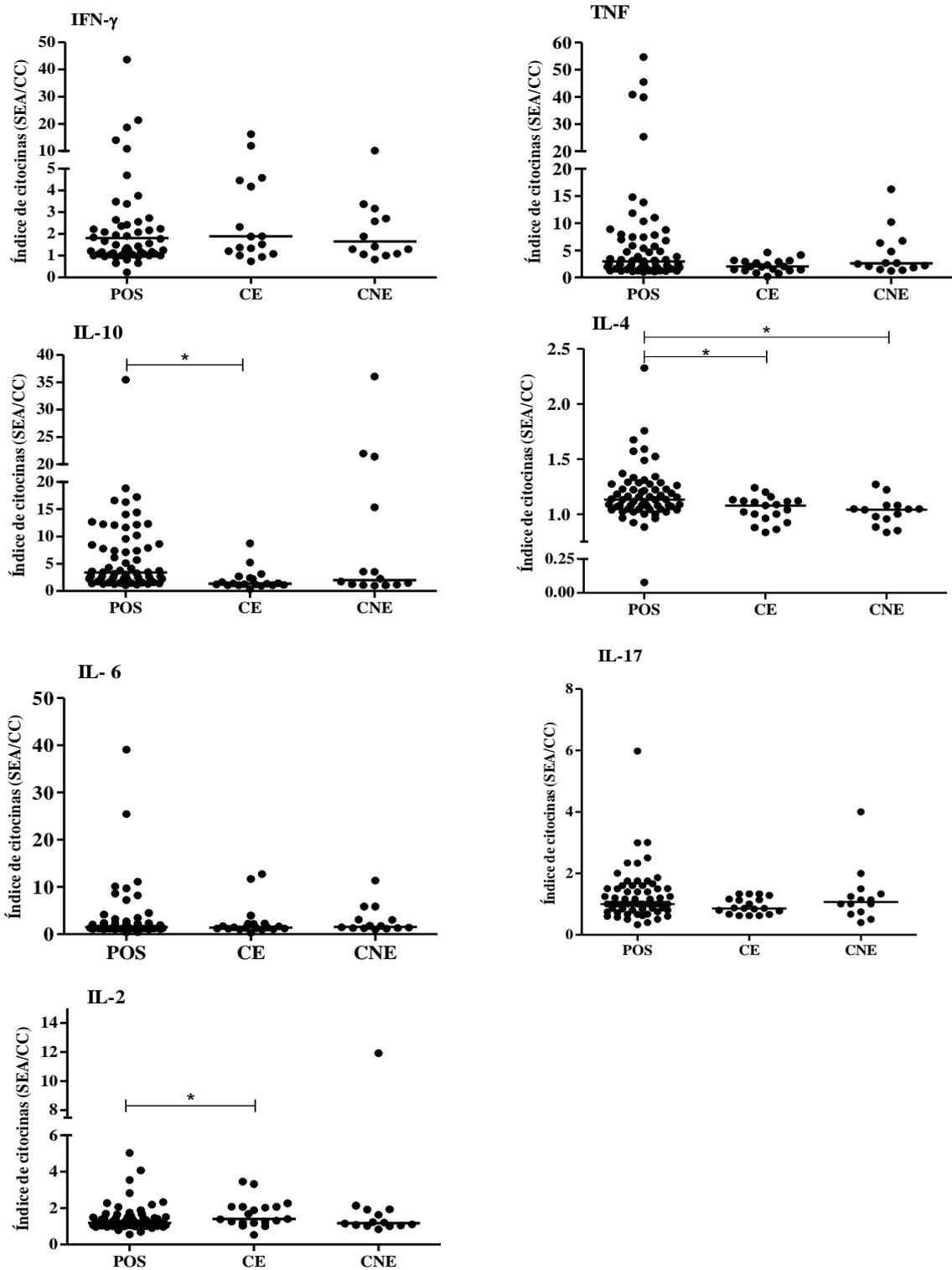
Citocinas pertencentes a resposta Th1 como TNF e IFN- γ são importantes no recrutamento inicial de células como eosinófilos, macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos que formam o granuloma inicial. Em uma etapa posterior, o granuloma adquire um tamanho maior na qual são observados níveis maiores de IL-4 e IL-5 (PEARCE et al., 1991; BOROS, 1994; WEINSTOCK, 1992).

Em um estudo realizado por Chensue et. al (1993), foi demonstrado que na formação do granuloma em camundongos, havia a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-4. Além disso, foi observado que no início da reação inflamatória ocorre um aumento de IFN- γ e no auge da formação de granulomas ocorre um aumento expressivo de IL-4 (CHENSUE, 1993; FARIA, 2004). Pacientes com a forma intestinal exibem uma resposta mista Th1/Th2 com altos níveis de IL-4 em comparação a fase aguda e com aumento na frequência de células T produtoras de IL-10. Além disso, em indivíduos nos estágios iniciais de desenvolvimento da hepatoesplenomegalia foi demonstrado uma associação do perfil de citocinas Th2 (IL-5, IL-10 e IL-13) com fibrose severa. Como a doença hepatoesplênica é uma complicação crônica da doença, é concebível que mecanismos imunes sejam responsáveis para a ocorrência da fibrose no início dessa forma clínica (MAGALHÃES et al., 2005; DE JESUS et al. 2004).

Entretanto, a IL-10 também tem sido associada ao controle da progressão do granuloma. Em um estudo realizado por Falcão et. al (1998) foi demonstrado que o bloqueio da IL-10 em PBMC de indivíduos infectados durante o desenvolvimento do granuloma *in vitro* resultou no aumento do diâmetro do granuloma. Alguns autores avaliaram o papel de certas citocinas na regulação da fibrogênese e da fibrólise. Em modelos animais, foi demonstrado que as citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) contribuem para a formação de granulomas e desenvolvimento de fibrose, uma vez que essas citocinas estimulam a proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular (HENRI et al., 2002; ZHONG et al. 2005).

Sendo assim, os altos níveis de IL-4 e IL-10 estão intimamente relacionados com a resposta imunológica frente a deposição dos ovos do parasito e consequente formação do granuloma, onde a IL-4 característica de uma resposta do tipo Th2 e a IL-10 considerada uma citocina reguladora, podem contribuir para a formação do granuloma e consequente desenvolvimento de uma fibrose periportal.

Figura 6 – Indivíduos infectados com *S. mansoni* produzem maiores níveis de IL-4, IL-10 e menores de IL-2. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. POS (indivíduos positivos para *S.mansoni*); CE (indivíduos não infectados residentes em Xonim); CNE (indivíduos não infectados residentes em regiões de Governador Valadares não endêmica). O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



Fonte: dados da pesquisa.

*(POS): Indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

*(CE): Indivíduos não infectados pelo *S. mansoni* e residentes em área endêmica.

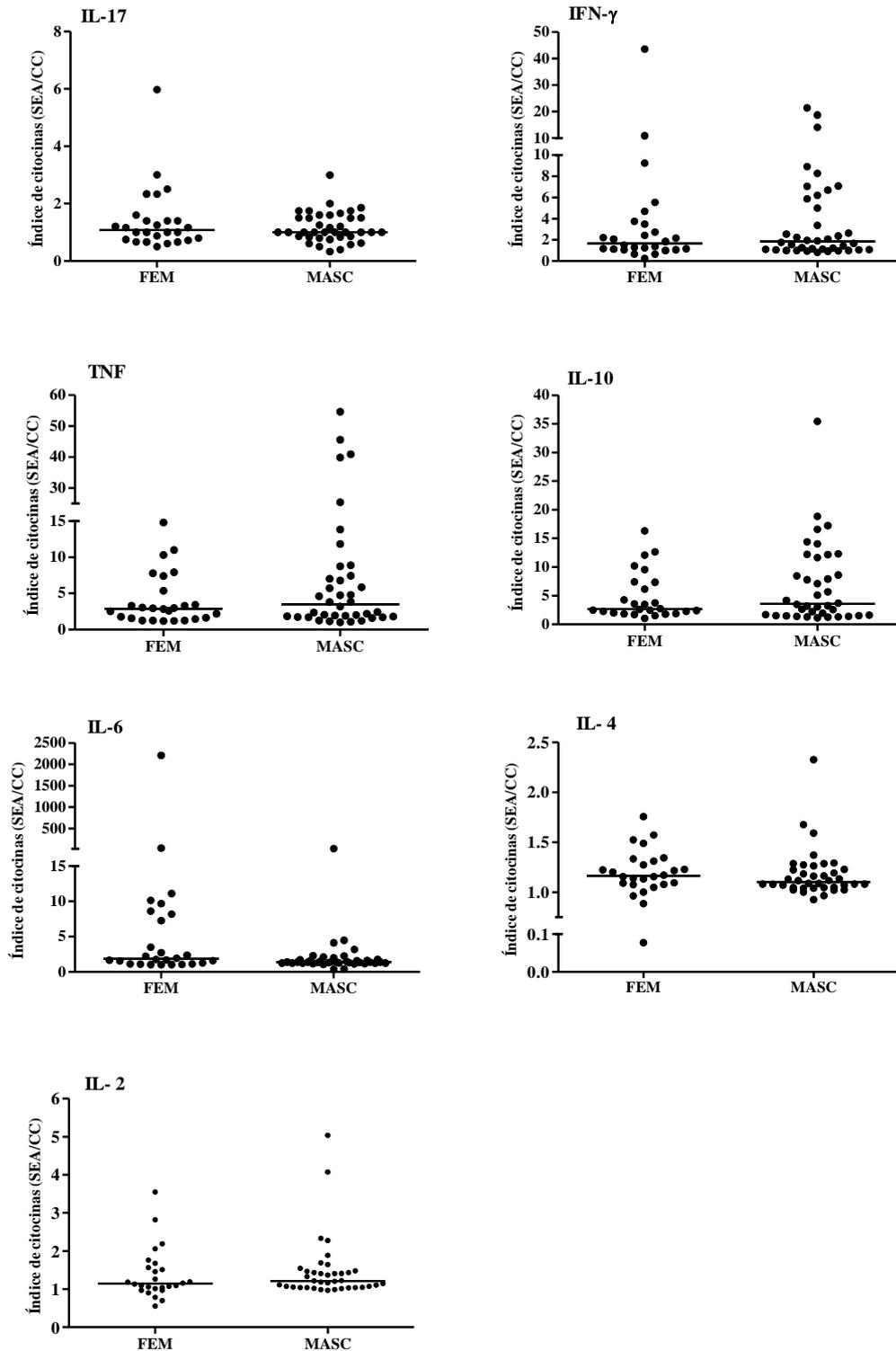
*(CNE): Indivíduos não infectados pelo *S. mansoni* e residentes em área não endêmica.

Uma vez que características demográficas, clínicas e biológicas interferem na infecção pelo *S. mansoni*, bem como no perfil imunológico do indivíduo, foram avaliadas as relações entre sexo, idade, carga parasitária, alteração na ecogenicidade periportal e expressão de ectonucleotidases com o perfil de citocinas produzidas por indivíduos infectados pelo parasito *S. mansoni*. O objetivo dessa análise é identificar possíveis fatores associados a alterações na resposta imune durante a esquistossomose.

Com relação ao sexo, foi observado que dos 64 indivíduos positivos, 26 (40,6%) eram do sexo feminino e 38 (59,4%) do sexo masculino. Não foi possível observar relação significativa entre o sexo dos indivíduos e os níveis de produção das citocinas (Figura 7).

Apesar do nosso estudo não ter encontrado associação entre o sexo dos indivíduos infectados e os níveis de citocinas, um estudo realizado por Mohamed- Ali (1999) encontrou uma relação entre o indivíduo ser do sexo masculino e apresentar fibrose moderada. Segundo o estudo, a fibrose hepática seria mais acentuada nos homens, devido a presença de andrógenos que podem atuar diminuindo os níveis de interferon (IFN) γ , enquanto que os estrogênios têm o efeito oposto sobre o IFN- γ . Um outro estudo realizado em Uganda, demonstrou que a fibrose hepática na esquistossomose estava associado a variados perfis de citocinas dependendo do gênero (BOOTH et al., 2004).

Figura 7 – Avaliação da produção de citocinas em indivíduos do sexo masculino e feminino. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

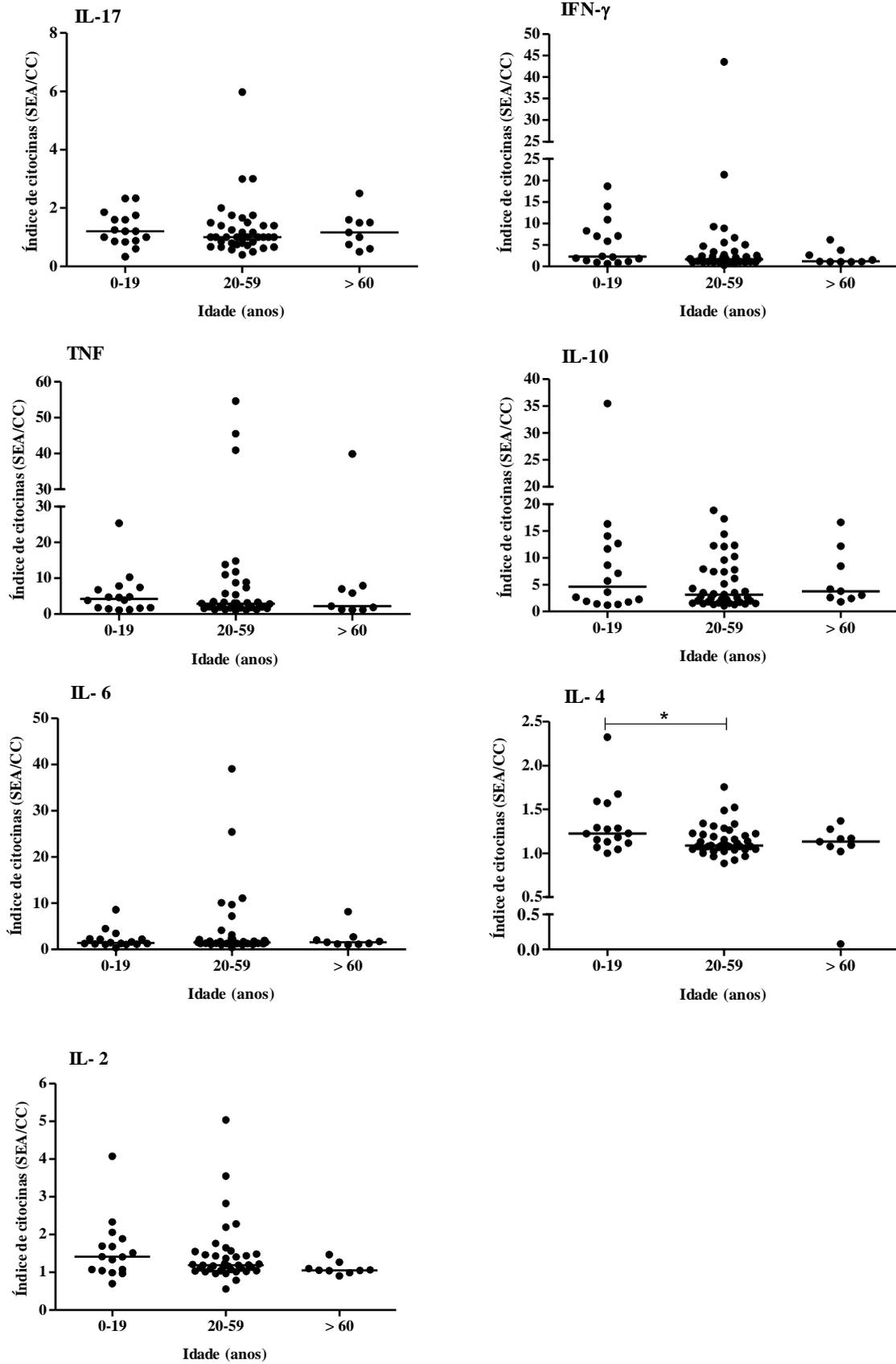


Fonte: dados da pesquisa.

A caracterização pela faixa etária nos permitiu observar que dos 64 indivíduos positivos, 16 (25%) indivíduos possuíam entre 0 a 19 anos, 39 (60,9 %) indivíduos tinham entre 20 a 59 anos e 9 (14,1%) indivíduos apresentavam-se com mais de 60 anos.

Foi observado que os indivíduos infectados que possuíam entre 0 a 19 anos produziram maior quantidade de IL-4 quando comparados aos indivíduos infectados que possuíam de 20 a 59 anos (Figura 8). A relação entre a IL-4 e a idade já foi demonstrada anteriormente por Faria (2004) que demonstrou haver um aumento nos níveis de IL-4 e diminuição de IFN- γ após estímulo com SEA por PBMC de indivíduos infectados com idade entre 10 a 24 anos. Oliveira (2010) também demonstrou que camundongos jovens reinfetados produziam maiores níveis de IL-4 quando comparado aos camundongos velhos reinfetados e não infectados.

Figura 8 – Indivíduos infectados que possuem entre 0 a 19 anos apresentam maiores níveis de IL-4 quando comparados aos de 20 a 59 anos. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



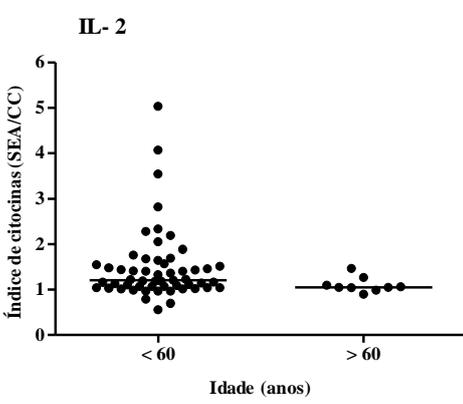
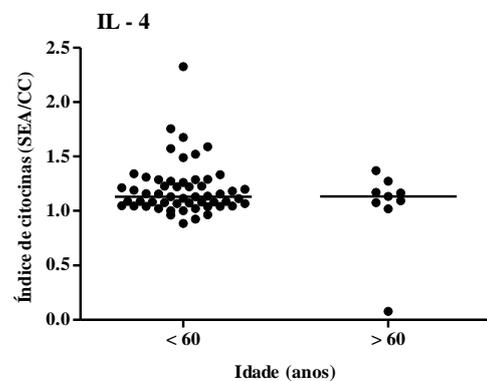
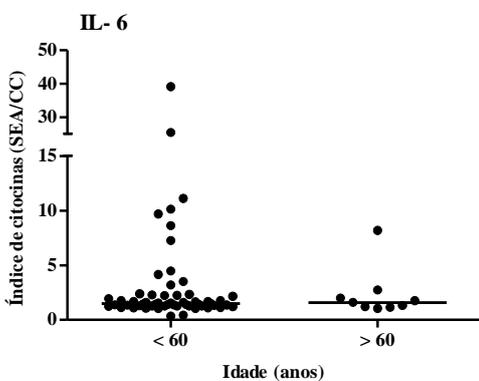
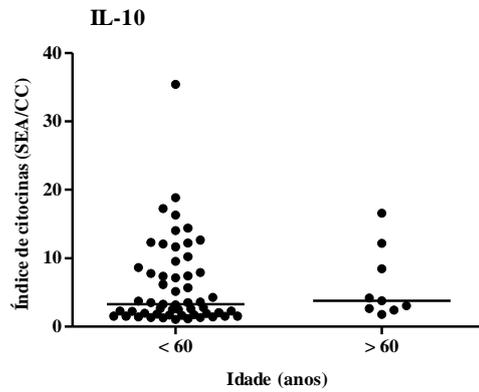
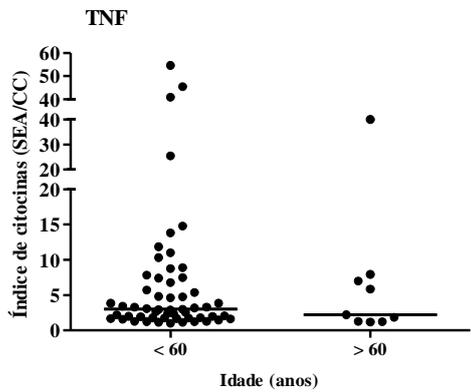
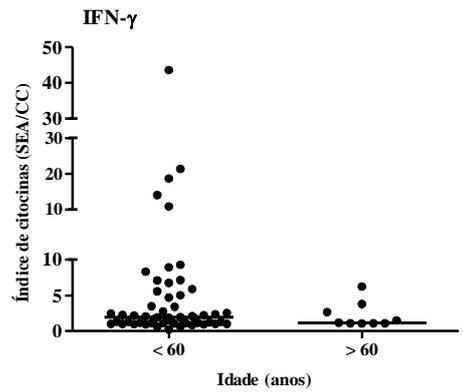
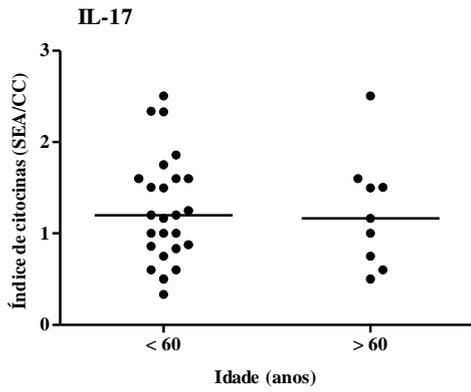
Fonte: dados da pesquisa.

A imunosenescência é um fator associado ao envelhecimento imunológico que está associado ao progressivo declínio da função imune, aumentando, assim, a suscetibilidade dos indivíduos para infecções, inclusive a esquistossomose, em média, após os 60 anos de idade.

Com o intuito de observar se a imunosenescência poderia interferir no perfil de citocinas produzidas pelas PBMC obtidas dos indivíduos infectados, esses foram agrupados nas faixas etárias maior e menor que 60 anos. Entretanto, não foi observada nenhuma associação entre o período de imunosenescência (> 60 anos) e a produção de citocinas (Figura 9).

Em um estudo realizado por Faria (2004) foi observado que o envelhecimento está interligado a um aumento nos níveis de IL-10, em cultura de células não estimuladas, em indivíduos idosos (70 a 95 anos) tanto em indivíduos controles como nos indivíduos infectados, indicando uma maior capacidade desses indivíduos em modular a infecção por *S. mansoni* comparado aos indivíduos mais jovens (10 a 24 anos). O aumento nos níveis de IL-2 também foi observado juntamente ao aumento nos níveis de IL-10, sugerindo um aumento da reatividade celular ou apoptose das células. Neste estudo também foi observado que a infecção nos indivíduos mais jovens provoca uma modificação na reposta imunológica, uma vez que normalmente ocorre uma participação de linfócitos T CD8⁺ caracterizado pelo aumento de IL-2⁺, IFN- γ ⁺ e IL-4⁺, e durante a infecção pelo *S. mansoni* observa-se uma diminuição de células produtoras de IL-2 e IL-4

Figura 9 – Avaliação da imunosenescência no perfil de citocinas produzidas por PBMC obtidas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

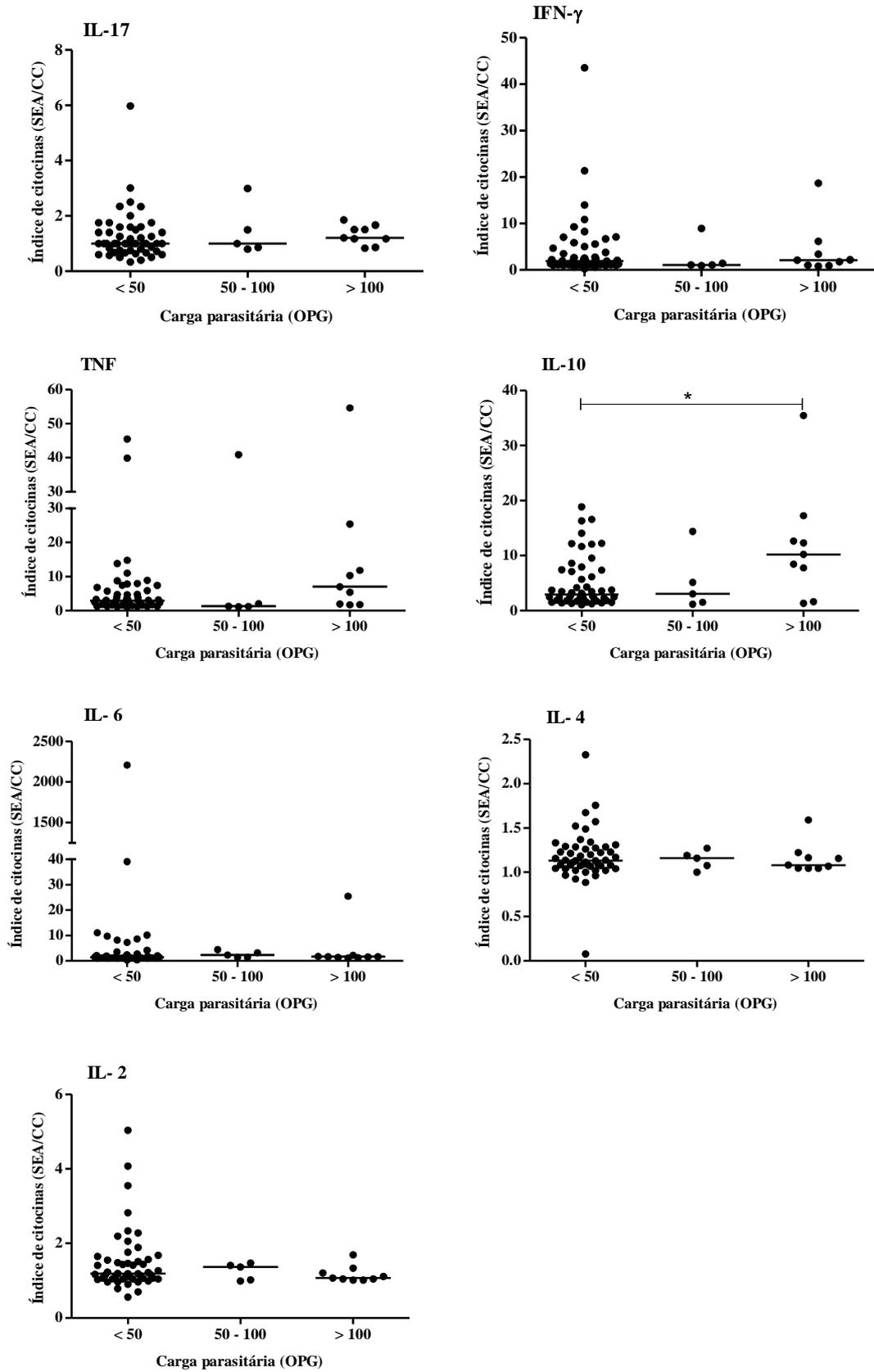


Fonte: dados da pesquisa.

A carga parasitária está intimamente relacionada a resposta imunológica na esquistossomose, uma vez que a resposta imune montada ao redor dos ovos do parasito que são depositados no sistema porta hepático são responsáveis pelas manifestações clínicas observadas na doença. Dessa forma, avaliamos o perfil de citocinas produzidas pelas PBMC obtidas dos indivíduos infectados de acordo com a carga parasitária (CP) apresentada por esses indivíduos. Os indivíduos infectados (n = 64) tiveram suas amostras fecais submetidas ao método de kato-katz e foram agrupados em grupos de baixa CP (< 50 opg), média CP (entre 50 e 100 opg) e alta CP (> 100 opg). Foi observado que 50 (78,1%) indivíduos possuíam baixa carga parasitária, 5 (7,8 %) indivíduos possuíam média carga parasitária e 9 (14,1%) possuíam alta carga parasitária. Os dados nos permitiram constatar que os indivíduos infectados que apresentaram alta carga parasitária (> 100 opg) produziram maiores níveis de IL- 10 quando comparado aos indivíduos que possuíam baixa carga parasitária (< 50 opg) (Figura 10). Um estudo realizado por Lima (2005) encontrou um resultado semelhante, em que os níveis de IL-10 foram significativamente mais elevados em indivíduos que possuíam uma carga parasitária > 100 OPG quando comparado a indivíduos com CP < 100 OPG e indivíduos não infectados. Um outro trabalho realizado por Silveira et al. (2004) demonstrou que a estimulação de PBMC com SEA resultou em um aumento significativo nos níveis de IFN- γ em indivíduos negativos para ovos do parasito, enquanto indivíduos com intensidade de infecção superior a 100 ovos por grama de fezes (OPGs) apresentaram produção significativamente maior de IL-10. Além disso, foi demonstrado recentemente que ovos de *S. mansoni* parecem possuir propriedades moduladoras, pois a elevação da carga parasitária se mostrou essencial para a redução da reatividade alérgica através do aumento de IL-10, mesmo em uma área endêmica onde a população é frequentemente exposta a infecção (RESENDE et al., 2018).

Desse modo o aumento dos níveis de IL-10 associados ao aumento da intensidade de infecção pode ser um fator importante na imunopatologia da esquistossomose.

Figura 10 – Os indivíduos infectados que apresentam alta carga parasitária (> 100 opg) produzem maiores níveis de IL- 10 quando comparado aos indivíduos que possuem baixa carga parasitária (< 50 opg). Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. OPG: Ovos por Grama de Fezes. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de p <0,05 foram considerados significativos.

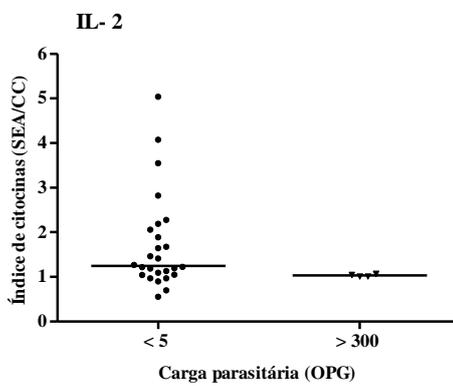
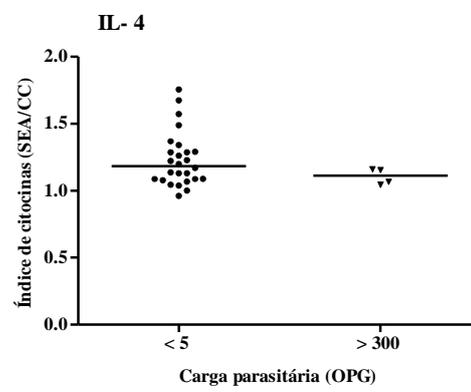
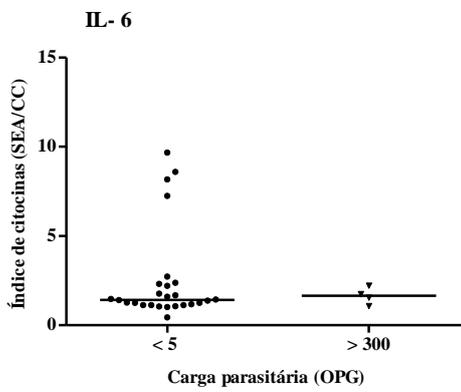
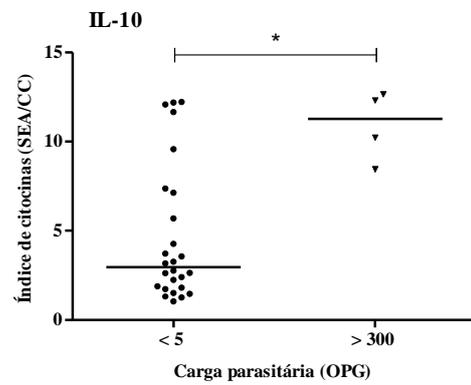
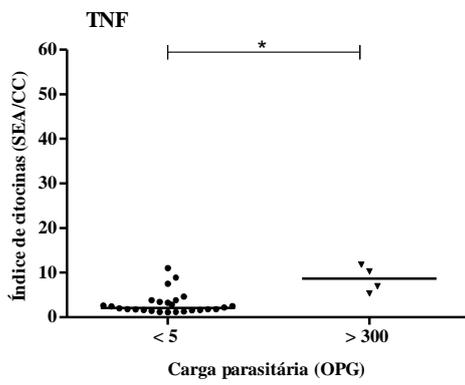
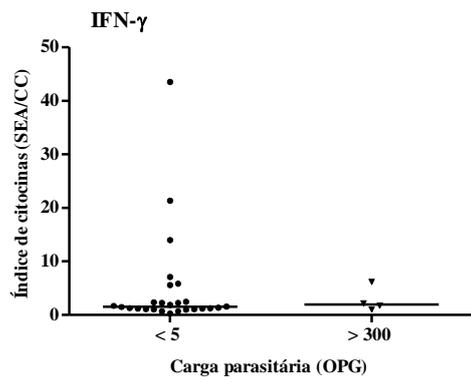
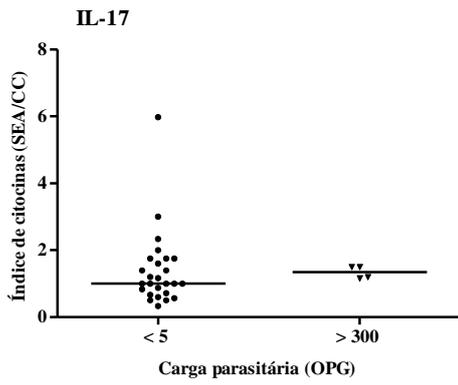


Fonte: dados da pesquisa.

A fim de verificar se cargas parasitárias extremamente baixas ou extremamente altas poderiam interferir no perfil de citocinas dos indivíduos, avaliamos os níveis de citocinas em indivíduos que apresentaram carga parasitária extremamente baixa (<5 OPG) e extremamente alta (> 300OPG) (Figura 11). Foi observado que os indivíduos que possuíam uma carga parasitária extremamente alta produziram maiores níveis de TNF e IL- 10 quando comparado aos indivíduos que possuíam carga parasitária extremamente baixa.

O aumento dos níveis de IL-10 em indivíduos com alta carga parasitária já havia sido demonstrado na Figura 5. Contudo, quando avaliamos os indivíduos que apresentavam carga parasitária acima de 300 OPG, observou-se também o aumento dos níveis de TNF. O aumento de TNF associado a carga parasitária também foi observado por Castro (2016), onde indivíduos com alta carga parasitária ≥ 100 OPG produziram significativamente maiores níveis de TNF quando comparado a indivíduos que apresentaram carga parasitária entre 4 a 99 OPG.

Figura 11 – Os níveis de TNF e IL-10 são maiores em indivíduos que possuem carga parasitária extremamente alta. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA por citometria de fluxo. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. OPG: Ovos por Grama de Fezes. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



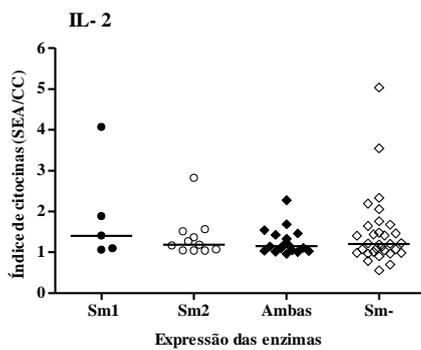
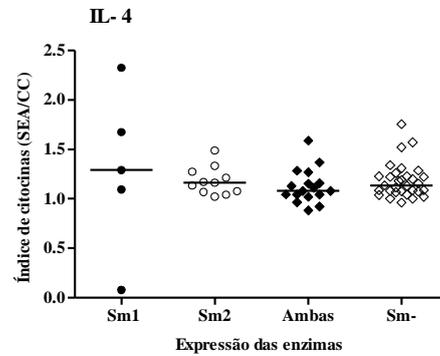
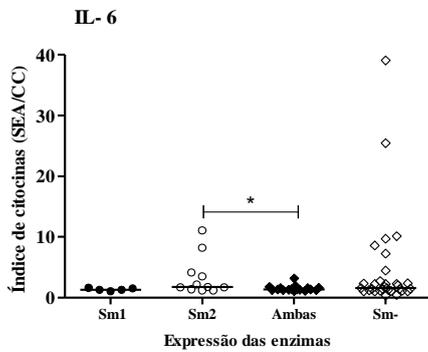
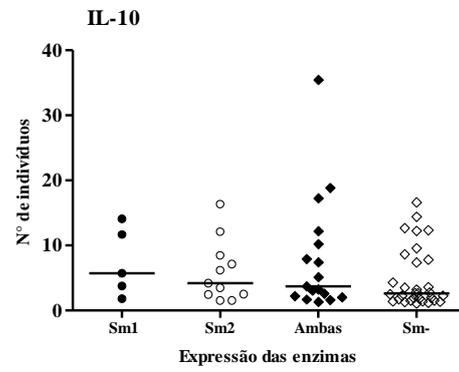
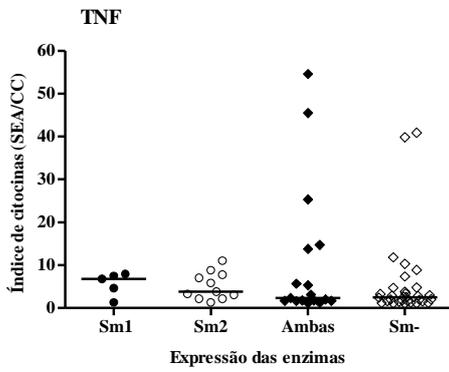
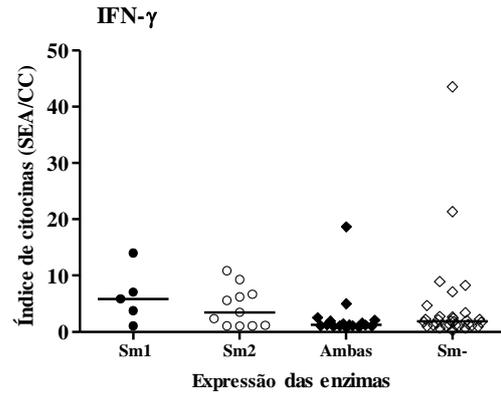
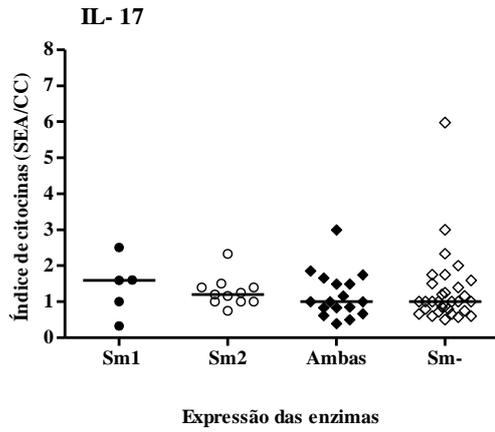
Fonte: dados da pesquisa.

Sabe-se que as ectonucleotidases são enzimas expressas pelo parasito que desempenham um papel imunomodulador através da quebra do ATP (molécula inflamatória) em adenosina (molécula anti-inflamatória). O presente estudo buscou investigar a relação das ectonucleotidases SmATPDase 1 e SmATPDase 2 com a resposta imunológica apresentada pelos indivíduos. Os níveis das citocinas foram comparadas entre os grupos que expressaram e não expressaram as enzimas em amostras fecais. Os grupos estudados foram: indivíduos que expressaram apenas a SmATPDase 1 (n= 5; 7,8%); indivíduos que expressaram apenas a SmATPDase 2 (n= 11; 17,2%); indivíduos que expressaram ambas as enzimas (n= 17; 26,6%) e indivíduos que não expressaram nenhuma das enzimas (n= 31; 48,4%). A análise indicou que os indivíduos infectados que expressaram apenas a enzima SmATPDase 2 em suas amostras de fezes produziram maior quantidade de IL-6 quando comparado aos indivíduos que expressaram ambas as enzimas (SmATPDase 1 e 2) (Figura 12). Assim, parece que a expressão da SmATPDase 2 promove um efeito inflamatório quando comparado a expressão de ambas as enzimas.

Hanley *et al.* (2004) demonstraram que o ATP, mesmo em baixas concentrações micromolares, aumentam a expressão de IL-6 em macrófagos humanos, possivelmente via ativação de receptores P2Y2. Esses autores sugerem que o ATP extracelular possa contribuir para a inflamação através da ativação de macrófagos durante a resposta imune. Além disso, a adenosina parece atenuar a produção de IL-6 por via celular em monócitos ativados com LPS (BOUMA *et al.* 1994). Pacheco et al. (2005) mostraram que a presença da adenosina deaminase (ADA), enzima que degrada Ado extracelular, quando co-localizada com receptores A2B em células dendríticas interage com CD26 de células T, o que constituiu um sinal co-estimulatório na sinapse imunológica, resultando no aumento da produção das citocinas Th1 como IFN γ , TNF α e IL-6.

Por outro lado, a associação da IL-6 com a adenosina foi demonstrada em doenças inflamatórias pulmonares, onde a ativação do receptor de adenosina A_{2B} foi capaz de aumentar em 14 vezes a liberação de interleucina-6 e induzir a diferenciação de fibroblastos pulmonares humanos em miofibroblastos (ZHONG et al. 2005). Foi demonstrado também que o receptor de adenosina A_{2B} é expresso em alta quantidade em macrófagos ativado pela via alternativa encontrados na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e fibrose pulmonar idiopática (FPI) (ZHOU et al, 2010). Além disso, Pedroza et al. (2011) buscou avaliar o efeito do tratamento de anticorpos neutralizantes de IL-6 em camundongos com fibrose pulmonar e observou uma redução na produção e deposição de colágeno e fibronectina no pulmão, além de uma diminuição no acúmulo de miofibroblastos nas vias aéreas.

Figura 12 – Os indivíduos infectados que expressaram apenas a enzima SmATPDase 2 em suas amostras de fezes produziram maiores níveis de IL-6 quando comparado aos indivíduos que expressaram ambas as enzimas (SmATPDase 1 e 2). Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA por citometria de fluxo. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. Sm1 (indivíduos que expressam apenas a SmATPDase 1 nas amostras de fezes); Sm2 (indivíduos que expressam apenas a SmATPDase 2 nas amostras de fezes); Ambas (indivíduos que expressam as duas enzimas, SmATPDase 1 e SmATPDase 2, nas amostras de fezes); Sm - (indivíduos que não expressam nenhuma das enzimas nas amostras de fezes) O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



Fonte: dados da pesquisa.

A alteração da ecogenicidade periportal é considerada uma complicação na esquistossomose, uma vez que a fibrose desencadeada por essa alteração é responsável pela morbidade da doença. Assim, avaliamos em nosso estudo o perfil de citocinas dos indivíduos que apresentaram alteração na ecogenicidade periportal. As alterações observadas variaram de 3 a 5 mm e são consideradas pela OMS como fibrose incipiente. Foi possível observar que os indivíduos infectados que apresentaram alteração na ecogenicidade periportal produziram maiores níveis de IL-10 e TNF e, menores níveis de IL-17 quando comparado aos indivíduos infectados, mas sem esta alteração (Figura 13).

Alguns estudos como o realizado por Hoffman et al. (2002) indicam que o desenvolvimento da fibrose na esquistossomose é influenciado por citocinas da resposta do tipo Th1 e da resposta do tipo Th2 como IL-4, IL-13, TNF- α e IFN- γ . A IL-10 atuaria promovendo uma regulação negativa na produção dessas citocinas, impedindo um dano tecidual maior (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000). Nesse mesmo estudo, camundongos infectados por *S. mansoni* e geneticamente modificados de modo a serem deficientes em IL-10/IL-4 foram polarizados na resposta Th1, e observou-se que todos os camundongos vieram a óbito ao longo da nona semana de infecção. Além disso, foi observado que houve perda de peso logo após o início da oviposição pelo parasito. A mortalidade dos animais foi atribuída ao aumento dos níveis de IFN- γ , TNF- α e NO induzível e à formação de granulomas não fibróticos.

Alguns estudos indicam que os pacientes portadores da esquistossomose hepatointestinal (EHI) reagem aos antígenos do *Schistosoma* com um perfil dominante de citocinas Th2, caracterizadas com um aumento nos níveis de IL-4 e IL-5, entretanto, com uma baixa de IL-10 quando comparados com pacientes na forma intestinal. Em pacientes hepatoesplênicos é observado uma fraca resposta Th2 associada com o aumento na produção de IFN- γ e TNF- α , e diminuição de citocinas como IL-5 e IL-10, causando uma resposta imunológica predominantemente pró-inflamatória (ABATH *et al.*, 2006; BURKE *et al.*, 2009; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008). Porém, baixos níveis na produção de IFN- γ e níveis elevados das citocinas TNF- α , IL- 4, IL- 5, IL-10 e IL-13 têm sido associados com um aumento no risco de desenvolver fibrose hepática severa na esquistossomose (ALVES-OLIVEIRA *et al.*, 2006; DE JESUS *et al.*, 2004).

Henri *et al.* (2002) demonstrou que a produção de IFN- γ em culturas de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com fibrose periportal moderada a severa é menor do que em culturas de indivíduos com fibrose periportal leve, enquanto que altos níveis de TNF- α estavam associados com a fibrose periportal moderada a severa. Esse estudo sugere, juntamente com os resultados de estudos experimentais sobre o papel de certas citocinas na

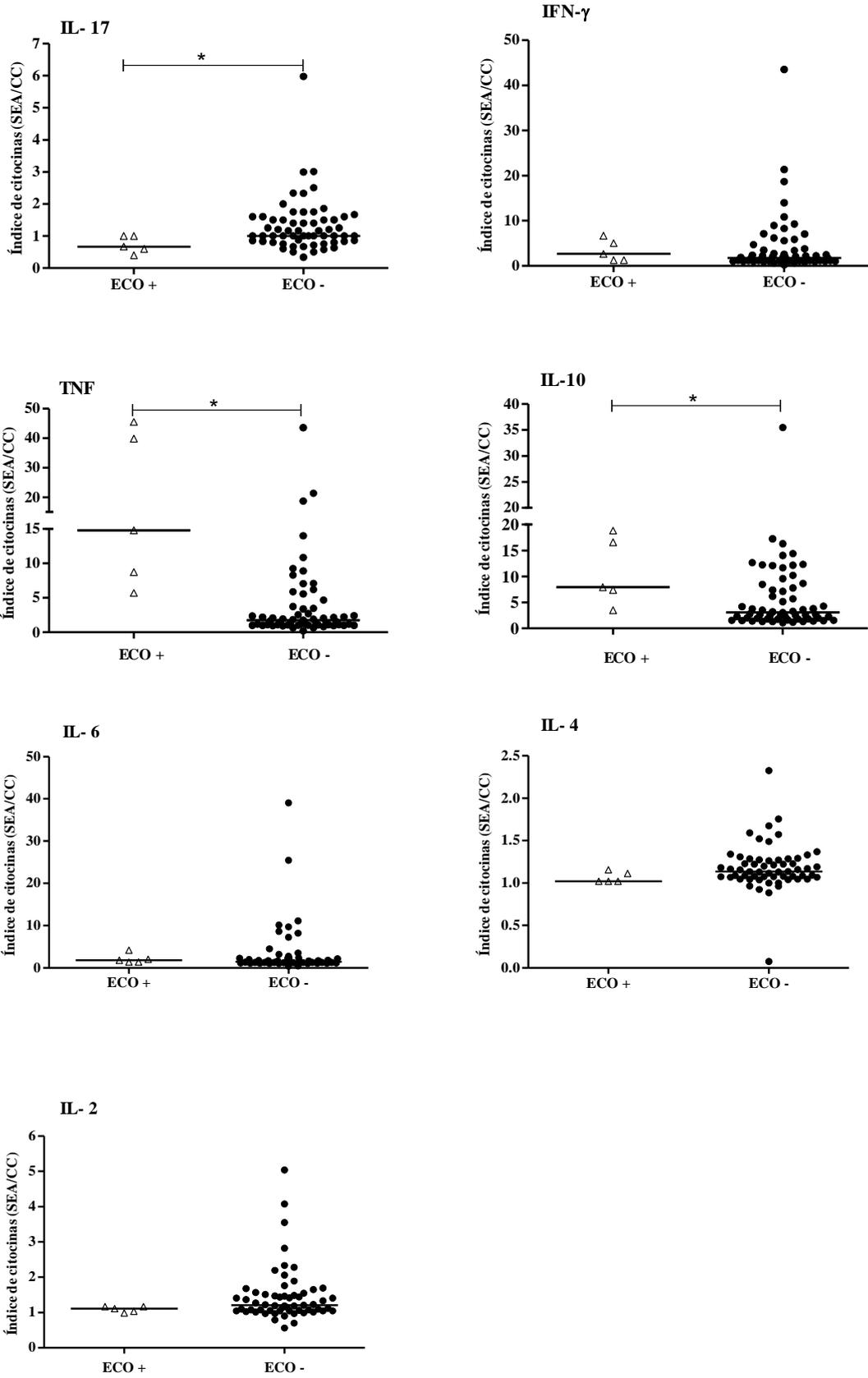
regulação da fibrose hepática induzida pelo *S. mansoni*, que o IFN- γ exerça um importante papel na proteção contra a fibrose periportal, enquanto que o TNF- α pode agravar a fibrose em indivíduos cronicamente infectados.

Diferente dos nossos dados, um estudo realizado por Booth et al. (2004) associou o surgimento de fibrose periportal na esquistossomose a uma baixa de IL-10 e IFN- γ . Como mencionado anteriormente, o perfil da produção de citocinas podem diferir dependendo do estadiamento da infecção e da extensão da fibrose periportal. Todos os indivíduos infectados que apresentaram fibrose periportal no nosso estudo, possuíam fibrose incipiente.

As células Th17 tem sido estudadas em relação a infecção pelo *S. mansoni* e sua presença tem se associado à agressão tecidual. Estudos recentes demonstraram que o aumento de adenosina em tecido com fibrose pulmonar está associado a elevação dos níveis de IL-17 e IL-6, importantes citocinas inflamatórias nesse modelo de fibrose (LUO *et al.* 2016; MBOW *et al.*, 2013). Em nosso estudo, os indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal apresentaram níveis inferiores de IL-17 e aumentados de IL-10 comparado aos indivíduos sem alteração na ecogenicidade periportal. Corroborando os nossos dados, Wilson et al. em 2010 demonstrou que a fibrose induzida por IL-17A pode ser suprimida pelo aumento da IL-10.

É importante ressaltar que a identificação de fatores associados a morbidade da esquistossomose é de extrema importância, uma vez que permite a intervenção na progressão da doença, impedindo assim, o surgimento de agravos como o desenvolvimento de fibrose periportal. Um estudo realizado em Córrego do Choro na cidade de Padre do Paraíso, Minas Gerais, com indivíduos infectados com *S. mansoni* e com baixa carga parasitária, demonstrou haver uma associação positiva entre a concentração plasmática de fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), Receptor solúvel de TNF (sTNFR1) e de quimiocinas CCL4, CCL3 com a espessura da vesícula biliar e / ou com a espessura da veia porta, que são marcadores de fibrose hepática, podendo portanto, serem utilizadas como fatores de prognóstico da fibrose hepática induzida pela infecção pelo *S. mansoni* (OLIVEIRA et al., 2018).

Figura 13 – Indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal produziram maiores níveis de IL-10 e TNF e, menores níveis de IL-17. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas com SEA. Foi utilizado o índice de citocinas: Cultura estimulada com SEA/ Cultura não estimulada (SEA/CC) para avaliação dos níveis de citocinas. ECO + (indivíduos com alteração na ecogenicidade periportal; 3 a 5 mm); ECO - (indivíduos sem alteração na ecogenicidade periportal; < 3mm). O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



Fonte: dados da pesquisa.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, esses resultados sugerem que a resposta imune de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* pode contribuir para a morbidade da doença, uma vez que o aumento da carga parasitária e alterações na ecogenicidade periportal estão associadas a um aumento dos níveis de IL-10 e TNF, citocinas associadas ao desenvolvimento de fibrose. Além disso, é importante observar que fatores associados ao indivíduo, como a idade, bem como fatores relacionados ao parasito, como a expressão de ectonucleotidases, podem alterar a resposta imunológica do indivíduo durante a infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F. G. C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 145-148, out. 2006.
- ABBRACCHIO, M. P. e CERUTI, S. P1 receptors and cytokine secretion. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1-2, p. 13 -25, jan. 2007.
- ABDEL-WAHAB, M. F. et al. Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 4, p. 403- 408, abr. 1992.
- AFIFI, A et al. Epidemiology of Schistosomiasis among Villagers of the New Halfa Agricultural Scheme, Sudan. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 110 – 115, Jan–Mar. 2016.
- ALEIXO DE CARVALHO, L.S. et al. Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae), **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 207- 2014, dez. 2015.
- ALVES-OLIVEIRA, L.F. et al. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1215–1221, fev. 2006.
- ARAP SIONGOK, T. K. et al. Morbidity in schistosomiasis mansoni in relation to intensity of infection: study of a community in Machacos, Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, n. 2, p.273- 284, mar. 1976.
- AZEREDO, L. M. et al. Aspectos ultrassonográficos e hemodinâmicos da esquistossomose mansônica:avaliação pela ultrassonografia Doppler em áreas endêmicas. **Radiologia Brasileira**. São Paulo, v.43, n.2, p. 69-76, mar/abril 2010.
- BARBOSA, C. S. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta Tropica**, v.164, p. 10-19, dez. 2016.
- BETHONY, J. et al. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic área in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p.1665-1673, nov. 1999.
- BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?. **Trends Parasitology**, v. 25, n. 6, p. 256- 260, jun. 2009.
- BLACK, C. L. et al. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human Schistosomiasis Mansoni. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3,

p. 1 – 11, mar. 2010.

BOOTH, M. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- α , high TNF- γ , or Low Rantes, depending on age and gender. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1295–1303, jan. 2004.

BOROS, D.L. The role of cytokines in the formation of the Schistosome egg granuloma. **Immunobiol**, v. 191, n. 5, p. 441-450, out. 1994.

BOUMA, M. G. et al. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 9, p. 4159-4168, nov. 1994.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n.2, p. 358-404, nov. 2006.

BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v.6, n.5, p.1471-1482, mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnica**. Brasília (DF); 2014.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 136- 176, abr. 2009.

BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 393–408, jan.1985.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p.109-117, nov/dez. 2008.

CASTRO, V. N. **Perfil de citocinas e quimiocinas no sangue periférico de indivíduos com carga parasitária baixa na infecção pelo *Schistosoma mansoni***. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas. Minas Gerais. 2016.

CHAN, E.S. et al. Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 8, p. 1144- 1155, jun. 2006.

CHENSUE, S. W. et al. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells in vivo. **Journal of Immunology**, v.151, n. 3, p.1391-1400, ago. 1993.

CHIARAMONTE, M.G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 273-282, ago. 2001.

COURA-FILHO, P. The Use of Risk Factor Determination for Schistosomiasis in Endemic Areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n. 4, p. 464-472, out/dez. 1994.

COURA-FILHO, P. et al. Environmental and Social Determinants in Schistosomiasis Mansoni in Ravena, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 254-265, abril/Jun. 1995.

Da'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase 2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinergic Signal**, v. 10, n. 4, p. 573 – 580, dez. 2014.

DAWAKI, S. et al. Prevalence and risk factors of schistosomiasis among hausa communities in kano state, Nigeria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, p.1- 9, jul. 2016.

DE CASTRO, C. C. B, et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**.v.22, n.10, p. 921- 928, set. 2015.

DE JESUS, A. R. et al. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3391- 3397, jun. 2004.

DEMARCO, R. et al. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 4, p. 831–838, jun. 2003.

DE SOUZA, R. P, et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-10, nov. 2012, 1-10.

DESSEIN, A. J. P. et al. Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunology Investigations**, v. 21, n.5, p. 423-453, ago. 1992.

DIAS, L C de S. et al. Epidemiologia da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 254-260, 1994.

DI VIRGÍLIO, F. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, p. 587 -600. 2001.

ENK, M. J. et al. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 537-540, jul. 2010.

ESPIRITO – SANTO, M. C. C. et al. Abdominal ultrasound in the evaluation of fibrosis and portal hypertension in an area of schistosomiasis low endemicity. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, vol. 50, n. 2, p. 117 – 119, mar/abr. 2008.

ESTHER JR, C.R et al. Extracellular purines are biomarkers of neutrophilic airway inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 31, n.5, p. 949-956, maio. 2008.

FALCÃO, P. L. et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 10, p. 447 – 454, out. 1998.

FALLON, P. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **The Journal of Immunology**, v. 164, n.5, p. 2585 – 2591, mar. 2000.

FARIA-PINTO, P. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**, v.129, p.51-57. 2004.

FARIA-PINTO, P. et al. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 359-363, jun. 2006.

FARIA-PINTO, P. et al. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.4, p. 374-379, jul.2010.

FARIA, E. S. **Influência do envelhecimento no perfil de síntese de citocinas em indivíduos portadores de infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni***. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2004.

FOSTER, J.M., JOHNSTON, D. A. Helminth genomics: from gene discovery to genome sequencing. **Trends Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 241-242, jun. 2002.

FULFORD, A. J. C. et al. Puberty and age-related changes in susceptibility to *Schistosoma* infection. **Parasitology Today**, v. 14, n.1, p.23-26, jan.1998.

GAZZINELLI, G. et al. Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 6, p. 2891-2895, jun. 1983.

GOMES, A. C. L. et al. Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 25, n. 2, p. 243- 250, abril/jun. 2016.

GOMES, E. C. S.; DOMINGUES, A. L.C.; BARBOSA, C. S. Esquistossomose: Manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. **Fiocruz Pernambuco**. Recife. 2017. 144 p.

GRYSEELS, B. Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience? **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 380-384, out. 1994.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, set. 2006.

HASHMI, A. Z. et al. Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.

292, n.1, p. 1 -15, jan. 2007.

KABATEREINE, N. B. et al. Epidemiology and morbidity of *Schistosoma mansoni* infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, n. 12, p. 711 – 718, set. 2004.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 397- 400, nov/dez. 1972.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e cultura**. São Paulo, v. 55, n.1, p. 38-41, jan./mar.2003.

KATO, T.; MIURA, M. On the comparison of some stool examination methods. **Japanese Journal of Parasitology**. 1954; 3:35.

KLOETZEL, K. **Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansoni em uma população de Pernambuco. Suas correlações clínicas**. Tese. São Paulo. 1962.

HANLEY, P. J. et al. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca^{2+} and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 25, p. 9479 -9484. jun. 2004.

HENRI, S. et al. 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**, v.169, n. 2, p. 929- 936, jul. 2002.

HOFFMAN, W. A. ET AL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico, **J. publ. Hlth trop. Med.**, v. 9, p.283-98. 1934.

HOFFMANN, K. F. et al. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2- type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, v. 163, n.2, p. 927 – 938, jul. 1999.

HOFFMANN, K.F., A.W; CHEEVER, T.A; WYNN. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406-6416, jun. 2000.

LAMBERTUCCI, J. R. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 101 – 109, out. 2000.

LELO, A. E. et al. No Apparent Reduction in Schistosome Burden or Genetic Diversity Following Four Years of School-Based Mass Drug Administration in Mwea, Central Kenya, a Heavy Transmission Area. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1 – 11, out. 2014.

LEVANO – GARCIA, J. et al. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 384 – 389, jan. 2007.

LEWERT, R. M., YOGORE, M. G., J R; BLAS, B. L. Seroepidemiology of schistosomiasis japonica by ELISA in the Philippines. II. Unreliability of stool examination in the measurement of incidence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n.5, p. 872-881, set.1984.

LICHTENBERGOVÁ, L. et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 585-596, jul. 2008.

LIMA e COSTA, M. F. et al. Avaliação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE/PCDEN) em municípios situados na Bacia do Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba. v. 29, n. 2, p.117-126, mar/abr. 1996.

LIMA, T. F. **Análise de reinfecção pelo *Schistosoma mansoni* entre escolares com idade de 5 a 15 anos em área endêmica – Vale do Jequitinhonha**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2015.

LINSLEY, P. S.; CLARK, E. A.; LEDBETTER, J. A. T- Cell antigen, CD28, mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, v. 13, jul. 1990.

LUISA- SILVA, M. et al. Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 204, n. 6, p. 873-883, 2011.

LUO, F. et al. Extracellular adenosine levels are associated with the progression and exacerbation of pulmonary fibrosis. **The FASEB Journal**, v.30, n. 2, p. 874–883, nov. 2016.

MACHADO, M. M. *et al.* Aspectos ultra-sonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. **Radiologia Brasileira**. São Paulo, v.35, n.1, p. 41-45, jul. 2002.

MAGALHÃES, T.V. B. et al. Comparative clinical and ultrasound study of egg-negative and egg-positive individuals from *Schistosoma mansoni* low morbidity endemic areas, and hospitalized patients with hepatosplenic disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 1, p. 33-37, jan/fev. 2005.

MARCONATO, D. G. et al. Antischistosome antibodies change NTPDase 1 activity from macrophages. **Parasite Immunology**, p.1-7, ago. 2017.

MARCUS, A.J. *et al.* Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n.1, p. 9 -16, abr. 2003.

MARR, J. J. et al. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 544, n. 2, p. 360-371, dez. 1978.

MARTINS, A.V. **Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni**. Tese. Imprensa Oficial. Belo Horizonte, 1949.

MBOW, M. et al. Th17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **The**

Journal of Infectious Diseases, v. 207, n. 1, p.186–195, jan. 2013.

MENDES, R. G. P. R. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalisation of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.7, p. 808- 813, jul.2011.

MEURS, L. et al. Bladder morbidity and hepatic fibrosis in mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* Infections: a population-wide study in Northern Senegal. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1-8, set. 2012.

MIZUMOTO, N. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 358 – 365, abr. 2002.

MEYER- FERNANDES, J. R. Ecto-ATPases in protozoa parasites: Looking for a function. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 3, p. 299-303, set. 2002.

MOHAMED – ALI, Q. et al. Susceptibility to Periportal (Symmers) Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infections: Evidence That Intensity and Duration of Infection, Gender, and Inherited Factors Are Critical in Disease Progression. **The Journal of infectious Diseases**, vol. 180, n. 4, p. 1298 – 1306, out.1999.

MORAIS, C. N. L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568, set. 2008.

MUNIZ, V. S. et al. Purinergic P2Y12 Receptor Activation in Eosinophils and the Schistosomal Host Response. **Plos Neglected Tropical Diseases**, p. 1- 21, out. 2015.

NAUS, C.W. et al. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. **Tropical Medicine International Health**, v. 8, n. 6, p. 561-568, jun. 2003

NETO, O. B. L. et al. Análise espacial dos casos humanos de esquistossomose em uma comunidade horticultora da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 4, p. 771 – 780, ago. 2012.

OLIVEIRA, S.C. et al. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, n.2-3, p. 256-262, dez. 2008.

OLIVEIRA, R. P. **Efeitos da imuno-senescência na infecção murina pelo *Schistosoma mansoni***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas. Minas Gerais. 2010.

OLIVEIRA, S. D. S. et al. Macrophage P2X7 Receptor Function Is Reduced during Schistosomiasis: Putative Role of TGF- β 1. **Hindawi**, p.1- 13, ago. 2014.

OLIVEIRA, J. L. R. Plasma levels of innate immune mediators are associated with liver

fibrosis in low parasite burden *Schistosoma mansoni* infected individuals. **Journal of Immunology**, v. 87, n. 3, p. 1 – 13, jan. 2018.

OLVEDA, D. U. Diagnosing schistosomiasis-induced liver morbidity: implications for global control. **International Journal of Infectious Diseases**, Austrália, v. 54, p. 138-144, jan. 2017.

PACHECO, R. et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, jul. 2005.

PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 response by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p. 159 -166, jan. 1991.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499 – 511, jul. 2002.

PEDROZA, M. et al. Interleukin-6 Contributes to Inflammation and Remodeling in a Model of Adenosine Mediated Lung Injury. **Plos One**, jul. 2011.

PENIDO, M.L.O. et al. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, v. 570, n.3 p. 10-17, set. 2007.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 17, n. 3, p. 163- 175, jul/set. 2008.

RESENDE, S. D.; MAGALHÃES, F. C., RODRIGUES-OLIVEIRA, et al. Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- α and High Levels of IL-10 in Serum. **Frontiers Immunology**, v. 9, p. 1-14, jan.2018.

REY, L. **Parasitologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 351 p.

RICHTER, J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2, p. 161-183, maio. 2003.

ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. Pará, v. 7, n. 2, p. 27-32. 2016.

ROLLEMBERG, C. V. V. et al. Predicting frequency distribution and influence of sociodemographic and behavioral risk factors of *Schistosoma mansoni* infection and analysis of co-infection with intestinal parasites. **Geospatial Health**. Itália. v. 10, n. 1, p.13- 19. 2015.

ROUQUAYROL. MZ, ALMEIDA FILHO N. **Epidemiologia & saúde**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi; 2003. p. 289-311.

SANTOS, A. M.; MELO, A. C. F. L. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 44, n. 1, p. 97 – 99, jan/fev. 2011.

SCHULTE, G.L.; FREDHOLM, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 9, p. 813 -827, set. 2003.

SCOTT, J. A. The regularity of egg output of helminthic infestations, with especial reference to *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Epidemiology**, v.27, n.1, p. 155 -175, jan.1938.

SILVA, C. L. M. Purinergic signaling in schistosomal infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 39, n. 5, p. 316 – 325, out. 2016.

SILVEIRA, A. M. S. et al. 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**, v. 98, n. 9, p. 514 – 519, set. 2004.

SILVEIRA, A. M. S. et al. Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, p. 1- 20, jan. 2016.

SIQUEIRA, L. M. V. et al. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 341 -347, maio/jun. 2016.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300- 307, jul/ago. 2011.

TCHUEM TCHUENTE, L. A. Control of soil-transmitted helminths in sub-Saharan Africa: diagnosis, drug efficacy concerns and challenges. **Acta Tropica**, v. 120, p. 4–11, set. 2011.

TEIXEIRA- CARVALHO, A. et al. Cytokines, chemokine receptors, CD 4⁺ CD25^{HIGH+} T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 108, p.139-149, abr. 2008.

VASCONCELOS, E. G. et al. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 205- 2014, abr. 1993.

VASCONCELOS, E. G et al. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.36, p. 22139 –22145, set. 1996.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p.148 -157, out. 2003.

VITORINO et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 39 -45, jan/fev. 2012.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A.M. Modulation of granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni by enteric exposure to *Schistosoma* ova: In vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cell Immunology**, v. 108, n. 2, p. 452-459, set. 1987.

WEINSTOCK, J.V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: Interactions between the *Schistosoma* ova and the host. **Immunological Investigations**, v. 21, n.5, p. 455-475; ago. 1992.

WILSON, M.S. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n.2, p. 148 -154, fev/mar. 2007.

WILSON, M. S. et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p. 535–552, mar. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 1994. Disponível em: >
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 04 jun. 2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2019.Schistosomiasis. Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 04 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. Schistosomiasis Control, WHO/Ctd

YE, J. H; RAJENDRAN, V. M. Adenosine: An immune modulator of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 36, p. 4491–4498, set. 2009.

ZAKI, A. et. al. Morbidity of schistosomiasis mansoni in rural Alexandria, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 33, n.3, p. 695 – 710, dez. 2003.

ZHOU, Y. et al. Alterations in Adenosine Metabolism and Signaling in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Plos One**, fev. 2010.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

QUESTIONÁRIO

Identificação:

- Distrito: _____
1. Nome: _____ 2. ID: _____
3. Endereço: _____
4. Data da entrevista: ____/____/____
5. Sexo 1 () Masc 2 () Fem
6. Idade (anos completos): _____
7. Data de nascimento: ____/____/____
8. Que cor você acha que é sua pele?
0 () negra 1 () morena 2 () parda 3 () branca
9. Tempo de residência: _____
10. Ano de chegada: _____
11. Procedência da família (Bairro/localidade; Cidade; Estado) _____
12. Número de pessoas no domicílio: _____

Características Sociais

13. Até que série o sr(a) estudou?
0 () Superior completo
1 () Médio Completo / Superior
incompleto
2 () Fundamental II completo/Médio
Incompleto
3 () Fundamental II
completo/Fundamental II incompleto
4 () Analfabeto/Fundamenta I
incompleto

14. O Sr(a) trabalha? Com quê? (Aceita mais de uma opção)

- 0 () Trabalhador rural
1 () Serviços domésticos
2 () Serviços de nível médio ou
especializado (comércio, funcionário
da prefeitura, agente de saúde,
técnico, professor
3 () Aposentado ou Pensionista
4 () Estudante
5 () Não tem trabalho
6 ()
Outro: _____

15. Qual é a renda da sua família?

- 0 () Menos de 1 salário mínimo.
1 () Salário mínimo (R\$ 937,00).
2 () Mais de 1 até 2 salários mínimos
(mais de R\$ 937,00 a R\$ 1874,00).
3 () Mais de 2 salários mínimos (mais
de 1874,00).

Características da casa

Pedir permissão para conhecer a casa e
observar:

16. Número de cômodos: _____

17. Tipo de parede (Material de construção predominante)

- 0 () alvenaria
1 () tijolo de adobe rebocado
2 () tijolo de adobe sem reboco
3 () pau a pique (enchimento)
4 () madeira
5 () Material aproveitado
6 () Misto (sem
predominância): _____

18. Tipo de teto predominante

- 0 () telha de barro
1 () telha de amianto
2 () palha (capim)
3 () material aproveitado
4 () Misto (sem predominância):

19. Tipo de piso

- 0 () Chão batido
1 () Cimento queimado
2 () Cerâmica, lajota, ardósia
3 ()
Outro: _____

20. Na sua casa tem luz elétrica?

- 0 () Não
1 () Sim

21. Na sua casa tem banheiro?

- 0 () Não
1 () Sim

22. Onde você faz suas necessidades?

- 0 () Banheiro
1 () Mato
2 () Outro: _____

23. Para onde vão as fezes?

- 0 () Esgoto ligado a fossa

- 1 () Esgoto ligado ao córrego
2 () Esgoto a céu aberto

24. De onde vem a água que vocês usam na sua casa?

- 0 () Rede do SAAE
1 () Cisterna ou poço
2 () Nascente, mina
3 () Córrego, rio

25. O senhor (a) usa a água do córrego?

- 0 () Não. Ir para a pergunta 27.
1 () Sim

26. Pra que você usa a água do córrego?

(Após a resposta espontânea, perguntar sobre cada uma das atividades)

- 0 () Lavar roupa
1 () Lavar vasilha
2 () Tomar banho
3 () Nadar, refrescar
4 () Pescar
5 () Buscar água para a casa
6 () Agricultura
7 () Aguar plantas ou horta
8 () Brincar
9 () Lavar curral, chiqueiro
10 () Trabalhar nas valas (rego,

canal)

- 11 () Beber
12 () Outros: _____

27. Onde as pessoas da família costumam tomar banho?

- 0 () Chuveiro dentro do banheiro
1 () Chuveiro comunitário
2 () Rio/Lagoa/Córrego
3 ()

Outros: _____

28. Quais dos bens abaixo existem em sua casa?

- 0 () Carro. Quantos? _____
1 () Moto. Quantos? _____
2 () Televisão. Quantos? _____
3 () Rádio. Quantos? _____
4 () Celular. Quantos? _____
5 () Geladeira. Quantos? _____
6 () Micro-ondas. Quantos? _____
7 () Filtro de água.
Quantos? _____

Sobre a doença

(Agora vamos falar um pouco da doença que estamos estudando)

29. Você já tinha ouvido falar de xistose antes dessa pesquisa?

- 0 () Não. Ir para a questão 32.

- 1 () Sim

30. Você sabe como pega xistose?

- 0 () Não. Ir para a questão 32.
1 () Sim.

31. Como você acha que pega xistose?

- 0 () Caramujo
1 () Pela água
2 () Outro.

Qual? _____

32. Você já viu algum desses caramujos aqui?

(Apresentar o mostruário mesmo que o participante não tenha citado o caramujo).

- 0 () Não. Ir para a questão 34.
1 () Sim.

33. Onde você viu esse caramujo?

- 0 () Rio
1 () Córrego
2 () Vala
3 () Casa
4 () Outros. Especifique

34. Você sabe qual desses caramujos transmite a xistose? (Apresentar o mostruário)

- 0 () Reconhece o transmissor
1 () Não reconhece

35. Você já fez exame de fezes alguma vez?

- 0 () Não. Ir para a questão 43.
1 () Sim

36. Algum exame deu positivo para xistose?

- 0 () Não. Ir para a questão 43.
1 () Sim.
2 () Não sabe. Ir para a questão 43.

37. Quantas vezes o seu exame deu positivo para xistose?

- 0 () Uma vez
1 () Duas vezes
2 () Três vezes
3 () Quatro vezes
4 () Cinco ou mais vezes

38. Há quanto tempo você teve xistose?

- 0 () Menos de 1 mês
1 () Menos de 6 meses
2 () Há 1 ano
3 () Mais de 5 anos
4 () Mais de 10 anos

39. Você apresentou algum sintoma quando teve xistose?

- 0 () Não. Ir para a questão 41.
1 () Sim.

40. O que você sentiu quando teve xistose?

Resposta espontânea

- 0 () Dor na barriga (cólica abdominal)
 1 () Fraqueza, desânimo
 2 () Mal estar, indisposição
 3 () Dor nas pernas
 4 () Dor de cabeça
 5 () Evacuuou sangue
 6 () Outro: _____

41. Como você tratou a xistose?

- 0 () Tomou comprimido
 1 () Remédio caseiro.
 Qual? (Chá, raspa de pau, doce de mastruz-erva de Santa Maria, semente de abóbora, semente de mamão)

 2 () Outro: _____
 3 () Não tratou

42. Quem forneceu o medicamento?

- 0 () SUCAN (FUNASA)
 1 () Prefeitura
 2 () Hospital, Centro de Saúde, Posto de Saúde
 3 () Farmácia

4 () Pesquisa da FIOCRUZ/UNIVALE

43. Alguém da sua casa já teve xistose?

- 0 () Não. Ir para a questão 47.
 1 () Sim.
 2 () Não sabe. Ir para a questão 45.

44. Quantas pessoas?

- 0 () Criança (0-11 anos). Quantas? _____
 1 () Adolescente (12-19 anos). Quantas? _____
 2 () Adulto (20-59 anos). Quantas? _____
 3 () Idoso (> 60 anos). Quantas? _____

45. Entrevistador:

46. Entrevista concluída:

- 0 () Não 1 () Sim
 Se não concluída, por quê?

47. Respondeu a entrevista:

- 0 () Participante
 1 () Responsável

8.2 ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "Correlação entre a atividade e expressão de ecto-nucleotidases presentes em ovos de *Schistosoma mansoni*, obtidos de indivíduos residentes em área endêmica, com a presença de fibrose". Esse projeto de pesquisa é sobre a doença esquistossomose, também conhecida como xistosa que é uma doença causada por vermes que infectam as pessoas quando entram em contato com águas contaminadas. Esta doença, se não tratada, pode trazer consequências sérias como o crescimento do fígado e do baço. Atualmente já existem tratamentos eficazes contra ela, mas as pessoas podem pegá-la novamente com facilidade. A pesquisa contribuirá para obtenção de informações que poderão beneficiar outras pessoas em risco de adquirir esquistossomose no futuro, porque pode auxiliar os pesquisadores e profissionais da área da saúde a desenvolverem no futuro formas de tratamento mais eficazes ou maneiras de prevenir essa doença.

Os pesquisadores farão perguntas sobre sua idade, onde você mora e por quanto tempo mora nesse local e se já realizou alguma vez tratamento para xistosa. Será coletado três (03) amostras de fezes e uma (01) amostra de sangue (10ml). Será realizado o exame clínico e de ultrassonografia por médicos capacitados. A amostra de fezes será coletada utilizando um frasco coletor e encaminhada para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV. O sangue será coletado para fazer testes que irão mostrar como seu organismo se defende contra o verme que causa a esquistossomose e irão medir substâncias de defesa (tais como anticorpos, citodinas e outras substâncias presentes no sangue). O sangue será coletado por profissional treinado e todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável e será utilizado apenas uma única vez, portanto, não há risco de você ficar doente ou pegar alguma doença. A coleta de sangue causa leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta será realizada de modo mais confortável possível. As amostras de sangue serão armazenadas e conservadas sob refrigeração no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares onde constituirão um biorrepositório. Estas amostras serão utilizadas apenas para atender os objetivos deste projeto e não serão utilizadas em projetos futuros sem o seu consentimento.

O Sr. (a) será avaliado quanto à presença/ausência de helmintos intestinais e caso os exames mostrem que você tem algum verme você será encaminhado para o tratamento médico adequado. Os exames parasitológicos de fezes e exame de sangue serão realizados sem nenhum custo. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos. Serão garantidos o sigilo e privacidade das informações, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Em caso de publicação dos resultados da pesquisa você não será identificado. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, _____, portador do documento de identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, _____ de _____ de 20__ .

Nome	Assinatura participante	Data
Nome	Assinatura pesquisador	Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-UFJF

Campus Universitário da UFJF. Pró-Reitoria de Pesquisa.

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Bairro São Pedro

CEP: 36036-900 / Juiz de Fora – MG. Fone: (32) 2102- 3788 / Fax: (32) 1102 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Dias de atendimento: de segunda-feira à sexta-feira. Horário de atendimento: de 9h às 12h, e de 13h às 17h.

Nome do Pesquisador Responsável: Pauline Martins Leite

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares.

Endereço: Rua Israel Pinheiro, nº 2000, Bairro Universitário, CEP: 35020-220 / Governador Valadares – MG

Fone: (33) 88192791 / (33) 91590083 / E-mail: pauline.leite@ufjf.edu.br.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (No caso do responsável pelo menor)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "Correlação entre a atividade e expressão de ecto-nucleotidases presentes em ovos de *Schistosoma mansoni*, obtidos de indivíduos residentes em área endêmica, com a presença de fibrose". Esse projeto de pesquisa é sobre a doença esquistossomose, também conhecida como xistosa que é uma doença causada por vermes que infectam as pessoas quando entram em contato com águas contaminadas. Esta doença, se não tratada, pode trazer consequências sérias como o crescimento do fígado e do baço. Atualmente já existem tratamentos eficazes contra ela, mas as pessoas podem pegá-la novamente com facilidade. A pesquisa contribuirá para obtenção de informações que poderão beneficiar outras pessoas em risco de adquirir esquistossomose no futuro, porque pode auxiliar os pesquisadores e profissionais da área da saúde a desenvolverem no futuro formas de tratamento mais eficazes ou maneiras de prevenir essa doença.

Os pesquisadores farão perguntas sobre sua idade, onde você mora e por quanto tempo mora nesse local e se já realizou alguma vez tratamento para xistosa. Será coletado três (03) amostras de fezes e uma (01) amostra de sangue (10ml). Será realizado o exame clínico e de ultrassonografia por médicos capacitados. A amostra de fezes será coletada utilizando um frasco coletor e encaminhada para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV. O sangue será coletado para fazer testes que irão mostrar como o organismo se defende contra o verme que causa a esquistossomose e irão medir substâncias de defesa (tais como anticorpos, citocinas e outras substâncias presentes no sangue). O sangue será coletado por profissional treinado e todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável e será utilizado apenas uma única vez, portanto, não há risco de ficar doente ou pegar alguma doença. A coleta de sangue causa leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecem em alguns dias. A coleta será realizada de modo mais confortável possível. As amostras de sangue serão armazenadas e conservadas sob refrigeração no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares onde constituirão um biorrepositório. Estas amostras serão utilizadas apenas para atender os objetivos deste projeto e não serão utilizadas em projetos futuros sem o consentimento do participante ou seu responsável.

O menor, ao qual o Sr. (a) é responsável será avaliado quanto à presença/ausência de helmintos intestinais e caso os exames mostrem que ele tem algum verme ele será encaminhado para o tratamento médico adequado. Os exames parasitológicos de fezes e exame de sangue serão realizados sem nenhum custo. O Sr. (a), como responsável pelo menor, terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos. Serão garantidos o sigilo e privacidade das informações, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. O nome do menor ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Em caso de publicação dos resultados da pesquisa, o Sr. (a) e o menor pelo qual você é responsável não serão identificados. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) Responsável

Assinatura do (a) Pesquisador (a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-UFJF

Campus Universitário da UFJF. Pró-Reitoria de Pesquisa.

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Bairro São Pedro

CEP: 36036-900 / Juiz de Fora – MG. Fone: (32) 2102-3788 / Fax: (32) 1102 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Dias de atendimento: de segunda-feira à sexta-feira. Horário de atendimento: de 9h às 12h, e de 13h às 17h.

Nome do Pesquisador Responsável: Pauline Martins Leite

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares.

Endereço: Rua Israel Pinheiro, nº 2000, Bairro Universitário, CEP: 35020-220 / Governador Valadares – MG

Fone: (33) 88192791 / (33) 91590083 / E-mail: pauline.leite@ufjf.edu.br

8.3 ANEXO 3

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz).

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "Correlação entre a atividade e expressão de ecto-nucleotidases presentes em ovos de *Schistosoma mansoni*, obtidos de indivíduos residentes em área endêmica, com a presença de fibrose". Esse projeto de pesquisa é sobre a doença esquistossomose, também conhecida como xistosa que é uma doença causada por vermes que infectam as pessoas quando entram em contato com águas contaminadas. Esta doença, se não tratada, pode trazer consequências sérias como o crescimento do fígado e do baço. Atualmente já existem tratamentos eficazes contra ela, mas as pessoas podem pegá-la novamente com facilidade. A pesquisa contribuirá para obtenção de informações que poderão beneficiar outras pessoas em risco de adquirir esquistossomose no futuro, porque pode auxiliar os pesquisadores e profissionais da área da saúde a desenvolverem no futuro formas de tratamento mais eficazes ou maneiras de prevenir essa doença.

Os pesquisadores farão perguntas sobre sua idade, onde você mora e por quanto tempo mora nesse local e se já realizou alguma vez tratamento para xistosa. Será coletado três (03) amostras de fezes e uma (01) amostra de sangue (10ml). Será realizado o exame clínico e de ultrassonografia por médicos capacitados. A amostra de fezes será coletada utilizando um frasco coletor e encaminhada para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV. O sangue será coletado para fazer testes que irão mostrar como seu organismo se defende contra o verme que causa a esquistossomose e irão medir substâncias de defesa (tais como anticorpos, citocinas e outras substâncias presentes no sangue). O sangue será coletado por profissional treinado e todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável e será utilizado apenas uma única vez, portanto, não há risco de você ficar doente ou pegar alguma doença. A coleta de sangue causa leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta será realizada de modo mais confortável possível. As amostras de sangue serão armazenadas e conservadas sob refrigeração no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares onde constituirão um biorrepositório. Estas amostras serão utilizadas apenas para atender os objetivos deste projeto e não serão utilizadas em projetos futuros sem o seu consentimento. Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento.

Você será avaliado quanto à presença/ausência de helmintos intestinais e caso os exames mostrem que você tem algum verme você será encaminhado para o tratamento médico adequado. Os exames parasitológicos de fezes e exame de sangue serão realizados sem nenhum custo. Você terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos. Serão garantidos o sigilo e privacidade das informações, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Em caso de publicação dos resultados da pesquisa você não será identificado. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) menor

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-UFJF

Campus Universitário da UFJF. Pró-Reitoria de Pesquisa.

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Bairro São Pedro

CEP: 36036-900 / Juiz de Fora – MG. Fone: (32) 2102- 3788 / Fax: (32) 1102 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Dias de atendimento: de segunda-feira à sexta-feira. Horário de atendimento: de 9h às 12h, e de 13h às 17h.

Nome do Pesquisador Responsável: Pauline Martins Leite

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares.

Endereço: Rua Israel Pinheiro, nº 2000, Bairro Universitário, CEP: 35020-220 / Governador Valadares – MG

Fone: (33) 88192791 / (33) 91590083 / E-mail: pauline.leite@ufjf.edu.br.