

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES**  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA: AVALIAÇÃO DO  
RECEPTOR ANTAGONISTA DE IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) E DA RESPOSTA IMUNE  
CELULAR**

**RECIFE**  
**2014**

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA: AVALIAÇÃO DO RECEPTOR  
ANTAGONISTA DE IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) E DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunopatogênese de doenças crônicas, infecciosas e parasitárias

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Ph.D.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Silvia Maria Lucena Montenegro, Ph.D.

RECIFE

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- F475e Figueiredo, Anna Lígia de Castro.  
Esquistossomose mansônica humana: avaliação do receptor antagonista de IL-13 (IL-13ra2) e da resposta imune celular / Anna Lígia de Castro Figueiredo. - Recife: [s.n.], 2014.  
90 p. : ilus, graf, tab.  
Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.  
Orientadoras: Clarice Neuenschwander Lins de Morais, Silvia Maria Lucena Montenegro.
1. Citocinas - imunologia. 2. Citocinas - sangue. 3. Citocinas - uso terapêutico. 4. Receptores de citocinas - imunologia. 5. Receptores de citocinas - sangue. 6. Receptores de citocinas - uso terapêutico. 7. Esquistossomose mansônica - imunologia. 8. Esquistossomose mansônica - parasitologia. 9. Esquistossomose mansônica - sangue. 10. Fibrose hepática - imunologia. 11. Fibrose hepática - parasitologia. 12. Fibrose hepática - sangue. I. Morais, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Montenegro, Silvia Maria Lucena. ths. III. Título.

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA: AVALIAÇÃO DO  
RECEPTOR ANTAGONISTA DE IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) E DA RESPOSTA  
IMUNE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Biociências e Biotecnologia  
em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunopatogênese  
de doenças crônicas, infecciosas e  
parasitárias

Aprovada em: 16/04/2014

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Departamento de Imunologia do CPqAM/ FIOCRUZ

---

Dr<sup>a</sup> Valéria Rêgo Alves Pereira  
Departamento de Imunologia do CPqAM/ FIOCRUZ

---

Dr<sup>a</sup> Lilian Maria Lapa Montenegro  
Departamento de Imunologia do CPqAM/ FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que é minha fortaleza e meu porto seguro, e me deu forças para lutar pelos meus sonhos e sempre esteve me guiando;

Aos meus pais, Edson e Cremilda, os alicerces fundamentais da minha vida, que sempre acreditaram em mim e estiveram comigo apoiando todas as minhas decisões;

A minha irmã, Anna Carolina, que é mais que uma irmã; minha companheira, amiga, confidente que sempre esteve ao meu lado me apoiando e acreditando em mim;

Ao meu namorado, Paulo Henrique, meu amigo e companheiro que teve muita paciência comigo e esteve em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins;

A todos os meus familiares que estiveram presentes, direta ou indiretamente, me dando força e apoiando minhas conquistas;

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial aos meus amigos, Elisa, Laís, Renan, Romero e Sávio que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e me apoiando para seguir em frente;

As minhas amigas Maria Eduarda, Mariana, Sonelba, Aline e Janaína, grandes companheiras, que entenderam minha ausência em alguns momentos e contribuíram com carinho e amizade em mais essa etapa de minha vida;

Ao pessoal do departamento de Imunologia, do LIBM, em especial Fábria, Vlademir, Neidinha, Ana Karine, Vírginia, Tetsu, Aracely, Roni e Andréia, por me ajudarem em etapas fundamentais do meu projeto; sou muito grata a vocês;

Aos componentes da Banca, por terem aceitado fazer parte desse momento tão especial de minha vida;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a FACEPE, pelo espaço, materiais e pelo financiamento necessários para a realização da minha pesquisa;

As minhas orientadoras, Dr<sup>a</sup> Clarice Moraes e Dr<sup>a</sup> Silvia Montenegro, que me deram a oportunidade de desenvolver minha dissertação, me proporcionando momentos de muito conhecimento e aprendizagem. Agradeço de coração, pelo apoio, ensino e paciência;

A Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Coutinho e a técnica Neide, do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE pelo apoio e conhecimentos gerados durante a seleção dos pacientes;

Os meus sinceros agradecimentos.

*“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.”*  
**Clarice Lispector**

FIGUEIREDO, Anna Lígia de Castro. Esquistossomose mansônica humana: avaliação do receptor antagonista de IL-13 (IL-13 $\alpha$ 2) e da resposta imune celular. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## RESUMO

Estudos indicam que citocinas Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) reduzem a fibrose na esquistossomose mansônica, enquanto que as Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) tem papel crítico na patogênese da doença. O desenvolvimento da resposta Th2 é dependente de IL-4, mas estudos revelaram a IL-13 como a mediadora da fibrose. Os mecanismos de controle da IL-13 estão ligados aos receptores desta citocina. O receptor IL-13R $\alpha$ 2, conhecida como “receptor antagonista” se liga com alta afinidade a IL-13, e estudos identificaram a sua participação na diminuição da fibrose e tamanho do granuloma. O principal objetivo desse projeto é avaliar o papel do IL-13R $\alpha$ 2 e da resposta imune celular nos diferentes graus de fibrose hepática e nas formas clínicas da esquistossomose mansônica humana. Os pacientes com diversas formas clínicas foram selecionados no Ambulatório de Gastroenterologia do HC- UFPE e avaliados através da ultrassonografia. As citocinas Th1 e Th2 foram dosadas através de citometria de fluxo e ELISA (IL-13 e IFN- $\gamma$ ), para a análise estatística foram utilizados testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis e o teste de correlação de Spearman considerando um  $p < 0,05$  como significativo. Foi encontrado uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) entre o IL-13R $\alpha$ 2 e a IL-13, sugerindo um aumento da citocina no início da fibrose. Foi encontrada correlação inicialmente negativa nos pacientes sem fibrose e posteriormente positiva, nos pacientes com fibrose grave, entre IFN- $\gamma$  e IL-13, salientando um novo mecanismo de regulação no processo de fibrose periportal na doença. Houve correlação positiva entre as citocinas do perfil Th1 e entre as citocinas do perfil Th2, sugerindo falta de supressão imunológica e presença de ambas às respostas, regulando a doença, com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados contribuirão para um melhor entendimento sobre os mecanismos imunes que controlam o processo de fibrogênese hepática em humanos e poderão ainda permitir um melhor entendimento da relação entre resposta imune celular e esquistossomose mansônica.

**Palavras chave:** Citocinas - imunologia. Citocinas - sangue. Citocinas - uso terapêutico. Receptores de citocinas - imunologia. Receptores de citocinas – sangue. Receptores de citocinas - uso terapêutico. Esquistossomose mansônica – imunologia. Esquistossomose mansônica – parasitologia. Esquistossomose mansônica - sangue. Fibrose hepática - imunologia. Fibrose hepática - parasitologia. Fibrose hepática - sangue.

FIGUEIREDO, Anna Lígia de Castro. Human schistosomiasis: evaluation of receptor antagonist IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) and cellular immune responses. 2014. Dissertation (Master's degree of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## ABSTRACT

Studies indicate that Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) cytokines reduce fibrosis in schistosomiasis, while Th2 (IL- 4, IL-5, IL- 6, IL- 10 and IL-13) plays a critical role in disease pathogenesis. The development of the Th2 response is dependent on IL-4, but studies have shown IL-13 as a mediator of fibrosis. Control mechanisms of IL-13 receptors are linked to this cytokine. The IL-13R $\alpha$ 2 receptor, known as "receptor antagonist" binds with high affinity to IL-13, and studies have identified their participation in the reduction of fibrosis and granuloma size. The main objective of this project is to evaluate the role of IL-13R $\alpha$ 2 and cellular immune response in varying degrees of hepatic fibrosis and the clinical forms of human schistosomiasis. Patients with different clinical forms were selected in the Clinic of Gastroenterology, HC-UFPE and evaluated by ultrasonography. Th1 and Th2 cytokines were measured using flow cytometry and ELISA (IL-13 and IFN- $\gamma$ ), for statistical analysis the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests and Spearman correlation test were used considering a  $p < 0.05$  as significant. A negative correlation ( $p < 0.05$ ) between the IL-13R $\alpha$ 2 and the IL-13 were found, suggesting an increase of the cytokine in early fibrosis. Initially negative correlation between IFN- $\gamma$  and IL-13 was found in patients without fibrosis and subsequently positive in patients with severe fibrosis, highlighting a new mechanism for regulating the process of periportal fibrosis disease. There was a positive correlation between the Th1 cytokines and between cytokines of the Th2 profile, suggesting a lack of immune suppression and the presence of both responses, regulating the disease, with varying degrees of periportal fibrosis. The results contribute to a better understanding of the immune mechanisms that control the process of hepatic fibrogenesis in humans and may also provide a better understanding of the relationship between cellular immune response and schistosomiasis.

**Keywords:** Cytokines - immunology. Cytokines - blood. Cytokines - therapeutic use. Cytokine receptors - immunology. Cytokine receptors - blood. Cytokine receptors - therapeutic use. Schistosomiasis mansoni - immunology. Schistosomiasis mansoni - parasitology. Schistosomiasis - blood. Liver fibrosis - immunology. Liver fibrosis - parasitology. Hepatic Fibrosis - blood.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Distribuição geográfica mundial dos casos de Esquistossomose	<b>15</b>
<b>Figura 2-</b> Hospedeiro intermediário da esquistossomose mansônica (caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> )	<b>16</b>
<b>Figura 3-</b> Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil	<b>17</b>
<b>Figura 4-</b> <i>Schistosoma mansoni</i> (macho e fêmea acasalados)	<b>19</b>
<b>Figura 5-</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	<b>21</b>
<b>Figura 6-</b> Receptores da IL-4 e IL-13 e vias de sinalização	<b>35</b>
<b>Figura 7-</b> Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Niamey	<b>40</b>
<b>Quadro 1-</b> Representação dos parâmetros selecionados na padronização do DuoSet ELISA IL-13R $\alpha$ 2	<b>51</b>
<b>Figura 8-</b> Níveis do IL-13R $\alpha$ 2 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>51</b>
<b>Figura 9-</b> Níveis do IL-2 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>52</b>
<b>Figura 10-</b> Níveis do IFN- $\gamma$ nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>53</b>
<b>Figura 11-</b> Níveis do TNF- $\alpha$ nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>53</b>
<b>Figura 12-</b> Níveis do IL-4 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>54</b>
<b>Figura 13-</b> Níveis do IL-6 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>55</b>
<b>Figura 14-</b> Níveis do IL-10 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>55</b>
<b>Figura 15-</b> Níveis do IL-13 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Características clínicas e epidemiológicas de pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013	<b>48</b>
<b>Tabela 2-</b> Grau de escolaridade, renda familiar e situação trabalhista dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013	<b>49</b>
<b>Tabela 3-</b> Região e último contato com águas infectadas dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013	<b>50</b>
<b>Tabela 4-</b> Correlações das citocinas nos grupos com diferentes padrões de fibrose periportal dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013	<b>57</b>
<b>Tabela 5-</b> Níveis do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 nos sobrenadantes de cultura celular após estímulo com antígeno solúvel de ovo (SEA) e sem estímulo (meio de cultura) de pacientes com diferentes formas clínicas da doença selecionados no HC/UFPE, 2013	<b>58</b>
<b>Tabela 6-</b> Comparação entre os níveis do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 entre as diferentes formas clínicas da doença nos pacientes do HC/UFPE, 2013	<b>59</b>
<b>Tabela 7-</b> Correlações das citocinas nos pacientes com as diferentes formas clínicas da Esquistossomose do HC/UFPE, 2013	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
BSA	Albumina do soro bovino
CBA	Cytometric bead array
CEP	Comitê de ética em pesquisa
ECM	Matriz extracelular
ECMP	Proteínas da matriz extracelular
EH	Esquistossomose Hepática
EHE	Esquistossomose Hepatoesplênica
EHI	Esquistossomose Hepatointestinal
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
FPP	Fibrose periportal
HC	Hospital das Clínicas
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
IL-13R $\alpha$ 1	Receptor $\alpha$ 1 da IL-13
IL-13R $\alpha$ 2	Receptor $\alpha$ 2 da IL-13
JAK	Ativador da transcrição
MHC II	Complexo de histocompatibilidade de classe II
MP	Metaloproteinases
NK	Natural killer
OMS	Organização mundial da saúde
PMA/IONO	Acetato de miristato forbol/Ionomicina
SEA	Antígeno solúvel de ovo
STAT-6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
SWAP	Antígeno solúvel do verme adulto
T.A.	Temperatura ambiente
TGF	Fator de crescimento tumoral
Th	Células T helper
TIMPs	Inibidores tissulares das metaloproteinases

TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
US	Ultrassonografia
$\gamma$ GT	Gama Glutamil Transferase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Epidemiologia da Esquistossomose</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Ciclo evolutivo e transmissão</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 Manifestações clínicas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 Diagnóstico</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5 Tratamento</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6 Fibrose hepática na esquistossomose</b> .....	<b>28</b>
<b>2.7 Imunopatologia da esquistossomose</b> .....	<b>29</b>
2.7.1 <i>Interferon-<math>\gamma</math></i> .....	<b>32</b>
2.7.2 <i>Interleucina 4 e Interleucina 13</i> .....	<b>33</b>
2.7.3 <i>Receptores da IL-4 e IL-13</i> .....	<b>34</b>
2.7.4 <i>Receptor <math>\alpha 2</math> da IL-13 (IL-13R <math>\alpha 2</math>)</i> .....	<b>35</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Geral</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Específicos</b> .....	<b>39</b>
<b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 Desenho de Estudo</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2 População de estudo</b> .....	<b>40</b>
<b>5.3 Cálculo Amostral</b> .....	<b>41</b>
<b>5.4 Antígenos e mitógenos</b> .....	<b>41</b>
5.4.1 <i>Preparação de antígeno</i> .....	<b>41</b>
5.4.2 <i>Utilização dos antígenos e mitógenos</i> .....	<b>42</b>
<b>5.5 Padronização do DuoSet ELISA IL-13R<math>\alpha 2</math></b> .....	<b>42</b>
5.5.1 <i>Determinação da cinética de produção do IL-13R<math>\alpha 2</math></i> .....	<b>43</b>
<b>5.6 Preparação celular e dosagem de citocinas</b> .....	<b>43</b>
<b>5.7 Detecção do IL-13R<math>\alpha 2</math> por ELISA</b> .....	<b>43</b>
<b>5.8 Detecção do IL-13 e IFN<math>\gamma</math> por ELISA</b> .....	<b>44</b>
<b>5.9 Detecção de citocinas Th1/Th2 por Cytometric Bead Array usando citômetro de fluxo</b> .....	<b>45</b>

<b>5.10 Análise Estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>6 ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>47</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>7.1 Características sócio-demográficas, epidemiológicas e clínicas.....</b>	<b>48</b>
<b>7.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura celular de sangue total em pacientes com graus de fibrose hepática esquistossomótica.....</b>	<b>51</b>
<i>7.2.1 Produção do receptor antagonista de IL-13 (IL-13Ra2).....</i>	<i>51</i>
<i>7.2.2 Citocinas do perfil Th1 (IL-2, IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math>).....</i>	<i>52</i>
<i>7.2.3 Citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13).....</i>	<i>54</i>
<b>7.3 Correlações observadas entre a produção das citocinas nos grupos de pacientes portadores da esquistossomose mansônica.....</b>	<b>56</b>
<i>7.3.1 Correlações observadas em pacientes do grupo controle (padrão de fibrose A).....</i>	<i>56</i>
<i>7.3.2 Correlações observadas em pacientes do grupo caso (padrão de fibrose C+D e E+F).....</i>	<i>56</i>
<b>7.4 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura celular de sangue total em pacientes com diferentes formas clínicas da esquistossomose</b>	<b>58</b>
<b>7.5 Correlações entre a produção das citocinas nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica</b>	<b>59</b>
<b>8 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>10 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz.....</b>	<b>88</b>

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

Na esquistossomose, grande parte das pesquisas, atualmente se baseia no entendimento da associação entre a resposta imunológica e a formação do granuloma e fibrose hepática (SOUZA *et al.*, 2012). Os granulomas esquistossomóticos estão associados com as células T helper (Th) CD4<sup>+</sup> e representam a reação de hipersensibilidade tardia. Estudos revelaram que citocinas do perfil Th1 interleucina (IL) 2, Fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  e Interferon (IFN)  $\gamma$  reduzem a patologia associada à fibrose, enquanto que citocinas do perfil Th2 (IL- 4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) tem papel crítico na patogênese da doença (FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da resposta Th2 é altamente dependente de IL-4 e da expressão de seu receptor tipo I, composto pela cadeia IL-2R $\gamma$  e IL-4R $\alpha$  (CHIRARAMONTE *et al.*, 1999; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).Entretanto estudos revelaram a IL-13 como a principal citocina pró-fibrótica, tanto em modelo murino (CHIRARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2012; MENTINK-KANE *et al.*, 2011) como em humanos (ALVES-OLIVEIRA *et al.*, 2006; JESUS *et al.*, 2004).

Os mecanismos de controle da atividade da IL-13 estão ligados aos receptores desta citocina que são formados por duas cadeias de ligação, receptor  $\alpha$ 1 da IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1) e receptor  $\alpha$ 2 da IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), sendo a única diferença estrutural entre elas o maior domínio intracelular da primeira cadeia. Além disso, o receptor IL-13R $\alpha$ 1 é uma cadeia de ligação de baixa afinidade, sendo necessário o recrutamento de outra cadeia de receptor, o IL-4R $\alpha$ , para a formação do complexo de receptores. As semelhanças funcionais entre as citocinas IL-13 e IL-4 (determinação do perfil de resposta Th2, além de proliferação e diferenciação de células B) devem-se ao fato de ambas compartilharem a mesma cadeia do receptor IL-4R $\alpha$  (FALLON *et al.*, 2000, ZHENG *et al.*, 2008).

A cadeia de ligação IL-13R $\alpha$ 2, conhecida como “receptor antagonista” se liga com alta afinidade a IL-13 sem a presença adicional de outra cadeia de receptor ( MENTINK-KANE *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2008). Além de existir em sua forma solúvel, esta cadeia é expressa em altos níveis em células como fibroblastos, na membrana e possui uma cauda citoplasmática (FENG *et al.*, 1998). Estudos em modelo murino de esquistossomose identificaram a participação do IL-13R $\alpha$ 2 na diminuição do granuloma, com promoção da sobrevivência do hospedeiro (MENTINK-KANE *et al.*, 2004), além de suprimir a fibrose e hipertensão portal (CHIARAMONTE *et al.*, 2003). Dessa maneira, o receptor antagonista inibe todas as principais características patológicas que definem a forma hepatoesplênica

---

---

severa em humanos, sendo considerado um mediador crítico na imunomodulação da doença (LIU *et al.*, 2012; MENTINK-KANE *et al.*, 2004; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

Existem evidências relacionando o aumento da expressão do IL-13R $\alpha$ 2 no soro dos pacientes esquistossomóticos com o nível de intensidade (através do número de ovos) da infecção (MENTINK-KANE *et al.*, 2004). Neste caso, as atividades protetoras do receptor antagonista revelados em modelo murino podem também se estender a doença humana (MENTINK-KANE; WYNN, 2004).

Os mecanismos de regulação do receptor antagonista (IL-13R $\alpha$ 2) ainda não foram elucidados em humanos (MENTINK-KANE; WYNN, 2004), sendo assim, baseado na literatura estudada, nosso estudo é pioneiro na avaliação do IL-13R $\alpha$ 2 relacionando-o com o processo de fibrogênese hepática. Dada a importância da infecção esquistossomótica, especialmente em Pernambuco, onde a mesma é endêmica, a elucidação dos mecanismos imunes que controlam o processo de fibrogênese hepática em humanos é de grande relevância para a busca de novos métodos não invasivos na identificação de estágios da doença, a fim de melhorar o acompanhamento terapêutico, determinar o grau/estágio da evolução clínica dos pacientes, além da busca de novos tratamentos devido ao aparecimento de resistência ao praziquantel (GREENBERG, 2013).

---

---



---

---

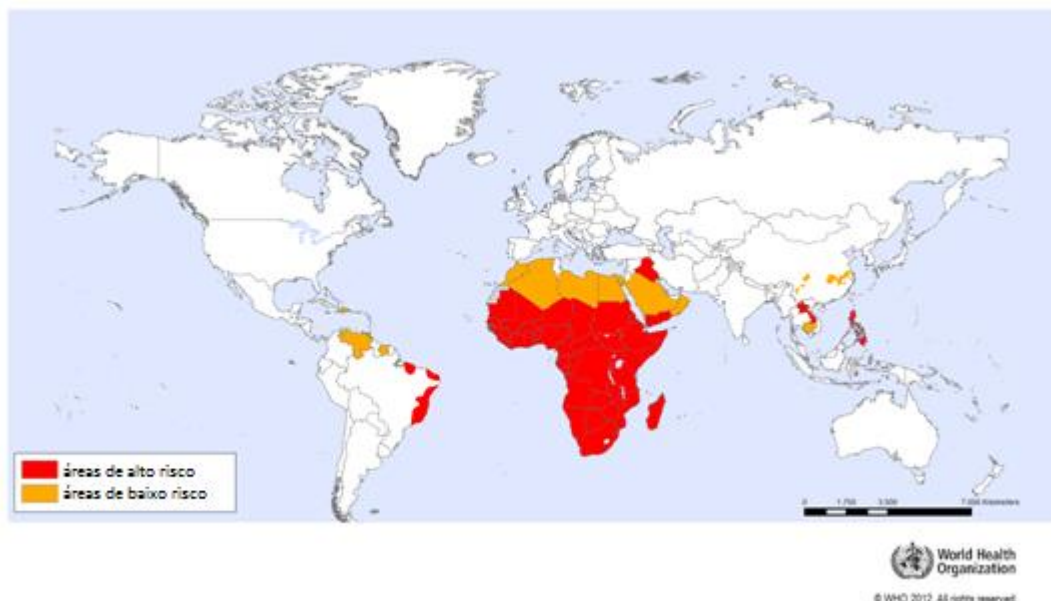
## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Epidemiologia da Esquistossomose

A doença foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão Bilharz em 1852, sendo conhecida, na época, como Bilharzíase. É a forma mais grave de parasitoses causadas por organismos multicelulares ((KATZ; ALMEIDA, 2003) e dentre as doenças parasitárias humanas, a esquistossomose mansônica é a segunda mais prevalente, ficando atrás apenas dos casos de malária (BICHLER *et al.*, 2001; UTZINGER *et al.*, 2001). No século XXI, a doença ainda representa um grave problema de saúde pública e possui grande importância sócio-econômica devido a sua ampla distribuição geográfica, cronicidade e impacto na economia, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005; UTZINGER *et al.*, 2001).

Atualmente, estima-se que 207 milhões estejam infectados em áreas rurais agrícolas e peri-urbanas, e 800 mil pessoas tenham risco de se contaminar. A doença está distribuída de forma endêmica atualmente em 77 países do mundo, incluindo África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela, Suriname (figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013; BRANDT *et al.*, 2010).

**Figura 1-** Distribuição geográfica mundial dos casos de Esquistossomose



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (2012)

---

---

---

---

No Brasil, a esquistossomose atinge milhões de pessoas e é popularmente conhecida como “barriga d’água” ou “xistose” (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES *et al.*, 2006). A espécie do parasita existente no país foi descrita em 1907, pelo inglês Sambon, que a denominou *Schistosoma mansoni* (KATZ; ALMEIDA, 2003). O surgimento da esquistossomose no país foi devido ao tráfico de escravos africanos e através de imigrantes orientais e asiáticos que eram portadores do parasita e, a presença do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) (figura 2), hospedeiros definitivos susceptíveis e condições ambientais semelhantes às da região de origem facilitaram a instalação e propagação do *Schistosoma mansoni* no território brasileiro. As três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* importantes para a doença são: *B. tenagophila*, *B. glabrata*, *B. straminea*, onde apenas as duas últimas são encontradas na região Nordeste (NEVES, 2006).

De acordo com Favre *et al.* (2001), é nas coleções hídricas das áreas endêmicas que grande parte da população, por questões sociais e econômicas, exercem a maioria de suas atividades do dia-a-dia. Assim, a existência de extensas áreas agrícolas com projetos de irrigação, amplos habitat aquáticos, aliados com a presença de caramujos transmissores da doença, ausência de infraestrutura e saneamento adequados, precariedade na educação sanitária, devastação ambiental, ocupação de terras por populações de baixa renda e mudanças ambientais que resultam do desenvolvimento de recursos hídricos e de crescimento e migração da população, contribuem para a expansão da doença e manutenção da endemia naquelas áreas onde a mesma já foi instalada. A doença, portanto, está relacionada com questões de pobreza e de saúde pública, sendo um indicativo sócio-econômico muito importante (MELO; COELHO, 2010; PORDEUS *et al.*, 2008; SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005).

**Figura 2-** Hospedeiro intermediário da esquistossomose mansônica (caramujo *Biomphalaria glabrata*)



Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (ESPÉCIE..., 2011)

---

---

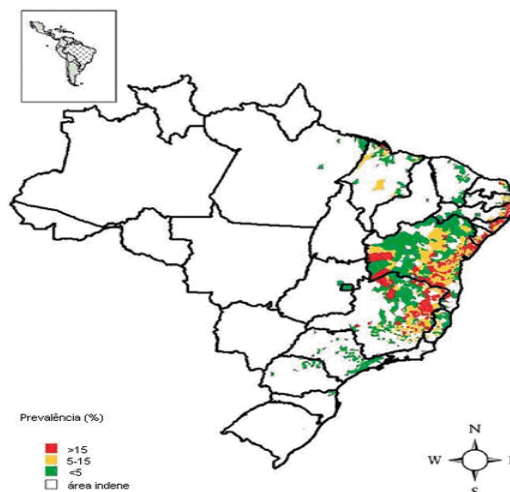
---

---

A expansão geográfica da esquistossomose é algo preocupante e, com exceção do foco isolado de Fordlândia (Pará), não existe notificação de extinção de outros focos de transmissão no Brasil (DOMINGUES; SILVA, 2011; NEVES, 2006). As prevalências humanas e o estabelecimento de novos focos de transmissão da doença no litoral demonstrando a contínua expansão tornam a esquistossomose cada vez mais cruel e largamente incapacitante, acarretando em danos irreversíveis na população afetada (BARBOSA; SILVA; SIMÕES, 1996). Estima-se que 7 milhões de brasileiros estejam infectados com o parasita e cerca de 30 milhões tenham risco de se contaminar (BRASIL, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; LEAL NETO *et al.*, 2013).

Atualmente, a doença é descrita em 18 estados e no Distrito Federal, e as regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste são as que concentram o maior número de casos. Das unidades federativas brasileiras, 8 (figura 3) são consideradas áreas endêmicas e atingem os estados do Maranhão até Minas Gerais. Em estados como Ceará, Distrito Federal, Goiás, Rio de Janeiro e São Paulo a transmissão não atinge grandes áreas, sendo considerada focal (BRASIL, 2010; LEAL NETO *et al.*, 2013).

**Figura 3-** Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil



Fonte: Amaral *et al.* (2006)

O país ainda é considerado uma das áreas mais endêmicas da doença em todo mundo, apesar de ter sido encontrada uma diminuição considerável no número de casos da forma grave hepatoesplênica da esquistossomose no Brasil e na mortalidade por hemorragia digestiva. Atualmente, estudos apontam para uma situação preocupante e longe da erradicação da transmissão da doença ou do parasita, e isso acarreta em graves consequências para o desenvolvimento do país (DOMINGUES; SILVA, 2011; FERREIRA; SILVA, 2007). A

---

---

região Nordeste, que foi a primeira área endêmica do país, é a que apresenta a prevalência mais elevada, e o aumento da esquistossomose urbana nessa região, revela a ameaça constante que a doença representa, sendo considerada ainda como um grave problema de saúde pública (BARBOSA; SILVA; SIMÕES, 1996).

Pernambuco ocupa o terceiro lugar em prevalência no Nordeste e nos últimos anos houve um aumento considerável dos casos registrados no estado, atingindo em torno de 17 mil indivíduos (DOMINGUES; SILVA, 2011). Fatores sócio-econômicos, culturais e biológicos contribuem para a endemia da doença e novas áreas de transmissão têm sido encontradas em regiões próximas ao litoral e na Região Metropolitana do Recife, demonstrando que a doença continua em expansão no estado. Nas áreas rurais, a doença continua a se manifestar predominantemente na forma crônica, afetando a população de baixa renda, enquanto que nessa expansão pelo litoral, a maioria dos casos encontrados afeta principalmente pessoas de classe médio-alta (PEREIRA *et al.*, 2010). A área endêmica em Pernambuco ocupa 102 dos 186 municípios (DOMINGUES; SILVA, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (2010) classificou a esquistossomose como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, pois é mais encontrada na população de baixa renda e educação, leva a discriminação social, atingindo principalmente mulheres, tem efeitos sobre a saúde da população, além de, atualmente, ser controlada através de meios viáveis.

O controle da esquistossomose é um desafio para os serviços de saúde pública, apesar de a doença ter diagnóstico e tratamento considerados simples. Fatores como: inexistência de métodos eficazes de controle contra propagação de moluscos, precárias condições de moradia, falta de saneamento básico, difusão rápida dos hospedeiros intermediários, frequência do contato humano com água infectada pelo molusco transmissor, seja por lazer, trabalho agrícola ou doméstico, além da falta de uma vacina capaz de prevenir a doença contribuem para a expansão da doença. Assim, é preciso que mais estudos científicos e investigações epidemiológicas, aliados a melhores condições de saneamento básico e educação sanitária, abranjam toda a complexidade da endemia, desde seus determinantes até a dinâmica das interações parasita-hospedeiro, com estratégias na busca de novos meios de controle da doença (PORDEUS *et al.*, 2008).

---

---

---

---

## 2.2 Ciclo evolutivo e transmissão

O gênero *Schistosoma* (pertencente à classe *Trematoda* e a família *Schistosomatidae*) é composto por platelmintos que apresentam sexos separados e um nítido dimorfismo sexual, contendo vários estágios de desenvolvimento (com ciclo de vida heteróxico), parasitando homens e animais (NEVES, 2006; SOUZA *et al.*, 2011). A infecção é causada por uma das 5 espécies de *Schistosoma*: *mansoni*, *japonicum*, *haematobium*, *intercalatum*, e *mekongi* (CHUAH *et al.*, 2014; UTZINGER *et al.*, 2001). As principais espécies contaminantes de humanos são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium* (JORDAN *et al.*, 1969). A diferença entre essas espécies reside na forma de infectar, incluindo penetração larval e oviposição da fêmea, além do tamanho, morfologia dos ovos, reações inflamatórias induzidas no hospedeiro e no número médio de ovos produzidos (WARREN, 1975).

O *Schistosoma mansoni* (figura 4) é a única espécie relatada no Brasil devido à inexistência dos moluscos suscetíveis a outras espécies (SOUZA *et al.*, 2011). O ciclo de vida do *S. mansoni* é complexo e apresenta uma fase de reprodução assexuada em um hospedeiro intermediário (caramujo *Biomphalaria*) e uma fase sexuada em um hospedeiro definitivo (UTZINGER *et al.*, 2001).

**Figura 4-** *Schistosoma mansoni* (macho e fêmea acasalados)



Fonte: Portal São Francisco (2013)

O ciclo biológico (figura 5) inicia quando, no sistema vascular do hospedeiro vertebrado, o *S. mansoni* atinge a forma adulta, alcançando as veias mesentéricas (principalmente a mesentérica inferior), locais onde machos e fêmeas copulam, ocorrendo à fecundação da fêmea. Essas fêmeas fecundadas, acopladas ou não aos machos, migram contra a corrente sanguínea até atingirem a submucosa de vasos menos calibrosos da parede

---

---

---

---

intestinal, e realizam a postura dos ovos. Cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia e cerca de 20% chegam ao meio externo (NEVES, 2006).

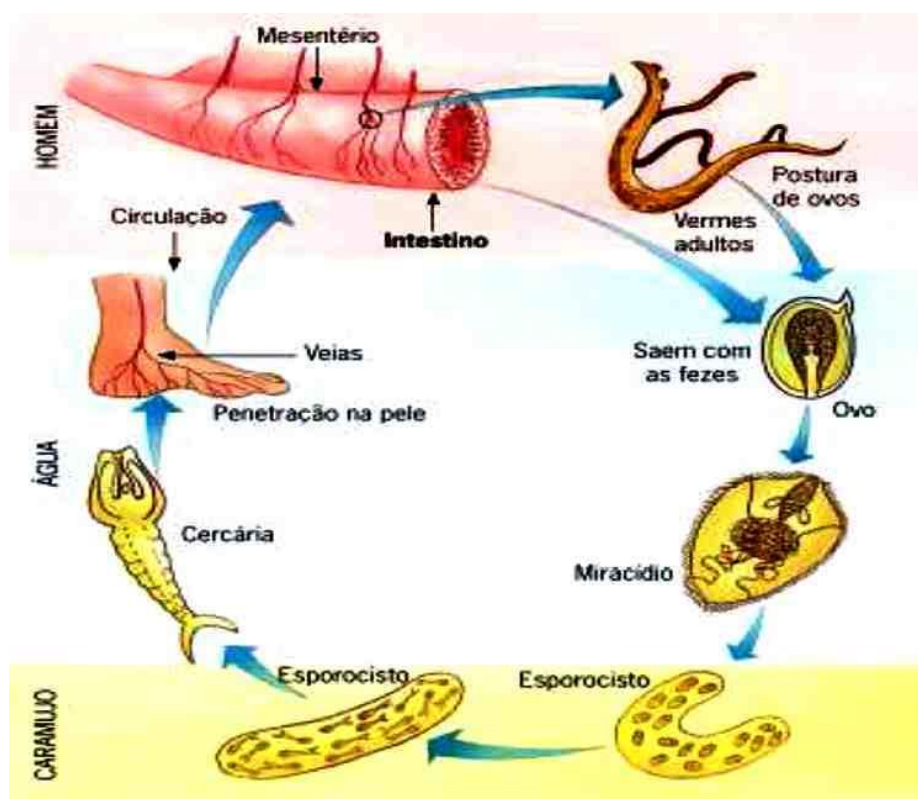
Os ovos levam cerca de uma semana para atingir a maturidade e contém em seu interior o miracídio formado. Diversos fatores contribuem para a chegada desses ovos à luz intestinal juntamente com o bolo fecal, tais como: perfuração da parede venular, reações inflamatórias, pressão dos ovos e adelgaçamento da parede dos vasos (NEVES, 2006; SOUZA *et al.*, 2011). Na água, os ovos liberam os miracídios (estimulados por temperatura elevada, luz intensa e oxigenação da água), e assim, esses miracídios podem penetrar nos moluscos vetores, não vetores e até mesmo em girinos. Porém, apenas aqueles miracídios que penetrarem no hospedeiro intermediário específico é que vão se desenvolver. No interior do molusco, os miracídios perdem seus cílios e transformam-se em esporocistos primários, que por poliembrionia originam os esporocistos secundários. Os esporocistos, então, migram do local de penetração dos miracídios até as glândulas digestivas dando origem as cercárias. Através do rompimento de vesículas que são formadas no tegumento do molusco, essas cercárias são liberadas atingindo a água. Nadando livremente, elas são atraídas por um hospedeiro definitivo, o homem, no qual se fixam entre os folículos pilosos e penetram ativamente na pele (SOUZA *et al.*, 2011).

O contato do homem com águas contaminadas com as larvas infectantes – cercárias - do *S. mansoni*, devido às atividades agrícolas, domésticas, de lazer ou entre outras é a maneira pela qual ocorre a transmissão da esquistossomose (BRASIL, 2010).

Além da pele, essas cercárias também podem penetrar através das mucosas e, após essa etapa, as larvas resultantes (chamadas esquistossômulos), migram pelo tecido subcutâneo e são levadas da pele até os pulmões, coração, sistema porta, veias mesentéricas, até alcançarem as alças intestinais do sigmóide e do reto. Uma vez no sistema porta intra-hepático, se alimentam até se desenvolverem e se transformar em formas adultas, completando o ciclo do helminto (SOUZA *et al.*, 2011).

---

---

**Figura 5-** Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

Fonte: Portal São Francisco (CICLO..., 2013)

### 2.3 Manifestações clínicas

A esquistossomose mansônica possui uma fase aguda e uma crônica e sua evolução clínica pode variar desde formas assintomáticas até formas mais graves. O homem adquire a infecção no momento da penetração da cercária através da pele, porém, a patogenia da doença depende de uma série de fatores do parasita e do hospedeiro definitivo. E esses fatores (tais como: resposta imune do indivíduo, carga parasitária, cepa, intensidade de infecção) vão estabelecer um amplo espectro das formas clínicas, desde leves até as mais graves e limitantes (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES, 2006).

A fase aguda corresponde à penetração das cercárias através da pele e pode ser assintomática ou sintomática (NEVES *et al.*, 2006). A forma assintomática ocorre na maioria dos portadores da esquistossomose e muitas vezes passa despercebida ou pode ser confundida com outras doenças, sendo necessários exames laboratoriais de rotina para seu diagnóstico (BURKE *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2006).

A forma sintomática é caracterizada pelo aparecimento de dermatite cercariana e da síndrome de Katayama (BURKE *et al.*, 2009; NEVES, 2006; PORDEUS *et al.*, 2008). A

---

---

dermatite é uma resposta de hipersensibilidade, mediada por IgE, contra a penetração cercariana, e é caracterizada por erupção papular eritematosa e pruriginosa persistindo até cinco dias após a infecção (BURKE *et al.*, 2009; PORDEUS *et al.*, 2008). A síndrome ou febre de Katayama corresponde a uma reação de hipersensibilidade mediada por imunocomplexos contra a migração dos esquistossômulos (forma imatura do parasita) ou deposição inicial dos ovos. Após três a sete semanas de infecção, o indivíduo apresenta febre, anorexia, cefaléia e dor abdominal, podendo apresentar em menor frequência, diarréia, náuseas, vômitos e tosse seca. O quadro geralmente regride espontaneamente, porém em alguns casos pode desenvolver uma doença mais persistente e complicada (BURKE *et al.*, 2009).

Através do exame físico é possível identificar um leve aumento do fígado e do baço, emagrecimento, febre, prostração, taquicardia e desidratação; e através do exame laboratorial é identificada uma intensa eosinofilia com leucocitose. Essas manifestações clínicas não ocorrem com frequência em indivíduos residentes em áreas endêmicas (que já são diagnosticados na maioria das vezes em plena fase crônica), sendo mais comumente encontrada em visitantes, imigrantes ou nas infecções primárias. Esses dados sugerem que os moradores dessas áreas podem estar de certo modo, “sensibilizados” face aos antígenos do parasita, devido à exposição precoce (PORDEUS *et al.*, 2008).

A fase aguda dura cerca de 60 dias e seus sintomas e sinais clínicos começam a melhorar gradualmente e, através de tratamento específico, até desaparecem. Porém, em indivíduos não tratados, a doença pode progredir para uma forma crônica comprometendo vários órgãos (BRASIL, 2010; KATZ; ALMEIDA, 2003). O ciclo de vida do parasita no hospedeiro, que começa com a penetração das cercárias na pele e termina com os vermes adultos nos ramos terminais da veia porta, explica porque o parasita pode danificar vários órgãos (SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005). A fase crônica representa o indicador de maior gravidade da doença em populações de algumas regiões do país, principalmente nas áreas com piores condições socioeconômicas (BARBOSA; GONÇALVES; MELO, 1995). Essa fase pode ser dividida em forma leve (assintomática, hepatointestinal e hepática) e a forma mais grave ou avançada (hepatoesplênica) dependendo do comprometimento do indivíduo. A forma hepatoesplênica ainda pode ser subdividida em compensada e descompensada (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

A forma assintomática é detectada apenas a partir de achados de ovos nas fezes dos pacientes, devido à falta de sintomatologia. Durante anos, utilizou-se uma separação em forma intestinal, porém, devido à semelhança clínica e patológica com a hepatointestinal (ambas apresentavam o mesmo comprometimento do fígado), essa forma caiu em desuso

---

---



---

---

(MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010). As manifestações clínicas da esquistossomose hepatointestinal (EHI) são encontradas principalmente em jovens e crianças. Os sintomas são caracterizados por náuseas, vômitos, diarreias, sensação de plenitude gástrica e dor abdominal. Nos casos crônicos graves, pode-se observar fibrose da alça retossigmóide, entretanto a maioria dos casos é benigna, sendo observadas diarreias sanguinolentas devido à passagem simultânea de uma grande quantidade de ovos pela luz intestinal (SOUZA *et al.*, 2011). Ao exame clínico, o fígado está aumentado, principalmente o lobo esquerdo, e o baço não é palpável (NEVES *et al.*, 2006). O diagnóstico dessa fase se baseia em exames parasitológicos positivos, juntamente com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. As dosagens de fosfatase alcalina e gamaglutamil transferase estão elevadas (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010). A nova divisão das formas clínicas da doença revela que a esquistossomose hepática (EH) pode apresentar-se assintomática ou com sintomas da forma hepatointestinal, a depender da carga parasitária e do acúmulo de ovos. Ao exame clínico, o fígado se torna, além de palpável, bastante endurecido (característica semelhante àquela observada na forma hepatoesplênica) (NEVES *et al.*, 2006). Ocorre fibrose hepática moderada a intensa, tipo Symmers, sem apresentar esplenomegalia. Alguns pacientes podem apresentar varizes esofágicas. A ultrassonografia (US) mostra geralmente uma fibrose periportal com padrão central (D) ou avançado (E) (classificação Niamey), que corresponde ao grau II pela classificação do Cairo (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

As alterações hepáticas iniciam no momento da oviposição dos ovos, pelas fêmeas do parasita, e na formação dos granulomas. Esses granulomas são formados tanto por substâncias antigênicas do ovo (SEA), como também por substâncias antigênicas do verme adulto (SWAP). Os ovos, então, são liberados nas veias mesentéricas e são carregados pela circulação para o interior do órgão. Estes, então, ficam retidos nos espaços porta e induzem uma vigorosa resposta imune com a formação de granulomas, conduzindo ao depósito excessivo de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular nas ramificações intra-hepáticas da veia porta e, conseqüentemente, levando ao surgimento de alterações hepáticas típicas. Com o efeito acumulativo das lesões granulomatosas, as alterações ficam cada vez mais sérias, levando ao desenvolvimento de uma fibrose periportal em torno das ramificações intrahepáticas, característica morfológica principal da forma grave mais avançada da doença (NEVES, 2006).

O aumento na pressão sanguínea portal, devido à fibrose hepática periportal, causa as conseqüências mais graves da infecção pelo *S. mansoni*. Com a evolução da doença, a fibrose periportal tende a progredir causando congestionamento do fluxo sanguíneo da veia intra-

---

---

hepática portal, e da veia esplênica o que contribui para o desenvolvimento da forma mais grave da doença, a esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (MANZELLA *et al.*, 2008), que se caracteriza pelo comprometimento e crescimento do fígado e baço. A forma hepatoesplênica representa de 4% a 12% dos pacientes encontrados em áreas endêmicas (DOMINGUES, 2008).

Em sua forma compensada, os sintomas da EHE associam-se, além daqueles já relatados para as formas mais leves, à hipertensão porta e a esplenomegalia, ambas podendo estar relacionadas com hemorragias, devido à ruptura de varizes esôfago-gástricas, com a presença de hematêmese (primeiro sinal da forma descompensada da doença). Os pacientes possuem sintomatologia inespecífica, como dores abdominais, alterações intestinais e desconforto no hipocôndrio esquerdo, devido ao aumento do baço (SOUZA *et al.*, 2011).

A forma descompensada é a principal causa de mortalidade da doença e caracteriza-se pela diminuição funcional do fígado. Pode-se encontrar ao exame físico ascite, hálito hepático, icterícia, queda dos pelos e até encefalopatias. No sangue há a presença de anemia, leucopenia (com a presença de neutropenia e eosinofilia) e plaquetopenia que se apresentam isoladas ou associadas e são atribuíveis ao hiperesplenismo (NEVES, 2006; SOUZA *et al.*, 2011).

## **2.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da esquistossomose, aguda ou crônica, é relativamente fácil, simples e rápido, e é dependente principalmente da detecção de ovos nas fezes do paciente (BURKE *et al.*, 2009; KATZ; ALMEIDA, 2003). O diagnóstico, aliado ao tratamento, é eficaz na diminuição da infecção, porém, a erradicação da doença só é possível com medidas que interrompam o ciclo evolutivo do parasita, através de melhoria no saneamento básico e mudança no comportamento das pessoas que vivem em áreas endêmicas (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O diagnóstico clínico pode ser realizado através de sinais e sintomas do paciente, aliados com dados epidemiológicos. Entretanto, existe a necessidade de confirmação através de exames laboratoriais e ultrassonografia (que fornecem informações mais seguras para justificar o diagnóstico), já que a esquistossomose pode ser confundida com outras doenças devido a diversidade de manifestações que ocorrem durante a sua progressão e em função da similaridade de sintomas com outras doenças (BRASIL, 2010).

---

---

Os métodos laboratoriais podem ser classificados em parasitológicos e imunológicos. Os parasitológicos (métodos diretos) detectam ovos do parasito nas fezes ou nos tecidos do paciente, e ainda são considerados como padrão-ouro para o diagnóstico da esquistossomose mansônica e por isso, são os mais usados atualmente. Dentre eles, destaca-se o método Kato-Katz, mais utilizado pelos programas de controle, e recomendado pela OMS, por ser o exame parasitológico de fezes mais rápido e eficaz (permite avaliar a eficácia de tratamentos e intensidade de parasitismo), além de ser de fácil execução (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O método Kato-Katz é o de escolha para inquéritos coproscópicos de rotina e em levantamentos epidemiológicos (BRASIL, 2010; NEVES, 2006). No entanto, em áreas onde a doença é de pouca gravidade, com a maioria dos portadores eliminando menos de 100 ovos do parasita por grama de fezes, a prevalência da doença fica subestimada, quando se emprega somente esse método no diagnóstico (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Resultados negativos nos exames parasitológicos de pacientes com infecção leve ou em fase crônica não excluem a possibilidade de infecção (BRASIL, 2010; NEVES, 2006).

Métodos auxiliares, como eclosão de miracídios, reações sorológicas, biópsia retal ou hepática são indicados apenas em casos de exame parasitológico de fezes negativo ou em condições muito especiais, entretanto, a biópsia hepática, para o diagnóstico exclusivo da esquistossomose, não deve ser recomendada, sendo utilizada apenas em condições especiais, em casos de diagnóstico diferencial ou quando há necessidade de conhecimento da histologia do fígado (BRASIL, 2010; NEVES, 2006).

Os métodos imunológicos (métodos indiretos) indicam a resposta do hospedeiro contra o antígeno do parasito. Entre as técnicas sorológicas mais utilizadas está o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (NEVES, 2006). O ELISA, além de proporcionar ensaios quantitativos, mostra-se muito bem aplicado em estudos populacionais, embora sua utilização, devido à falta de reagentes comerciais aplicáveis aos diagnósticos da doença, seja limitada (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Mas, apesar de possuírem boa sensibilidade, não permitem a confirmação absoluta do parasitismo devido à ocorrência de reações cruzadas com outras helmintoses dando resultados falso-positivos, além de permanecerem positivos após a cura do paciente (GRYSEELS *et al.*, 2006).

Existem ainda os métodos de imagem, no qual se destaca a ultrassonografia. O US é o mais utilizado por ser um método seguro, rápido, não invasivo, simples de ser realizado, não ter as desvantagens de irradiação, e ter, comparada aos outros métodos de imagem, um menor custo e maior aplicabilidade em estudos de campo (DOMINGUES, 2008). O US permite

---

---

---

avaliar a extensão, evolução, possível regressão da doença após a realização de tratamentos apropriados (SANTOS *et al.*, 2007).

Com base na OMS, a classificação dos graus de fibrose está relacionada com uma graduação subjetiva e objetiva. Na objetiva, ocorre uma análise quantitativa na qual se mede a espessura da fibrose periportal, que acomete principalmente a veia porta no hilo hepático e estende também para os ramos intra-hepáticos do sistema porta e para a região perivesicular. O espessamento fibroso periportal constitui-se em alterações que permitem uma identificação da doença, sendo caracterizado no US como área de hiperecogenicidade periportal. E na subjetiva ocorre uma análise qualitativa comparando o fígado examinado com determinados padrões de comprometimento pela fibrose periportal (BURKE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2007). A análise qualitativa é obtida através da classificação de Niamy (RICHTER *et al.*, 2001), a qual considera seis padrões de fibrose periportal denominados: A (ausência de fibrose); B (duvidosa); C (periférica); D (central); E (avançada) e F (muito avançada) (SANTOS *et al.*, 2007).

## 2.5 Tratamento

O uso de quimioterapia tem sido o método mais defendido no controle da esquistossomose mansônica, com benefícios de diminuição da morbidade da população (ERKO *et al.*, 2012). O tratamento da doença consiste na utilização de medicamentos específicos para a cura da infecção e deve ser utilizado em pacientes onde se observa a presença de ovos nas fezes ou na mucosa retal (BRASIL, 2010). Segundo a OMS, os programas de controles de parasitoses devem priorizar a população em idade escolar, devido as crianças representarem o grupo mais vulnerável de rápido crescimento da doença nos países endêmicos (FONTES *et al.*, 2003). A quimioterapia representa, nessas áreas endêmicas, um importante redutor da morbidade e é também valiosa para resolver casos individuais da doença (FERRARI *et al.*, 2003). Existem duas drogas para o tratamento de crianças e adultos: praziquantel e oxamniquine. Ambas as drogas são bem toleradas e a eficácia do tratamento gira em torno de 80% dos casos, em adultos e 70% em crianças de até 15 anos (BRASIL, 2010).

A introdução da oxamniquine como tratamento terapêutico na esquistossomose trouxe inúmeras esperanças para o controle da endemia e conseqüentemente uma redução na morbidade da população (BARBOSA; GONÇALVES; MELO, 1995). A droga é produzida por síntese biológica e pertence ao grupo químico aminoalquitolueno, atuando apenas na

---

---

espécie *Schistosoma mansoni* (sendo mais eficaz no sexo masculino do parasita). Sua ação está baseada em efeito anticolinérgico, aumentando a motilidade do parasito, como também inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Também é administrado via oral, com dose única em adultos, e em crianças é dividida em duas doses orais por dia de 10mg/kg. Os efeitos colaterais mais relatados são alucinações, tonturas e excitação (BRASIL, 2010; NEVES, 2006).

O praziquantel atua em todas as espécies do gênero *Schistosoma* e pertence ao grupo químico isoquinolino-pirazino, o que dificulta possíveis reações cruzadas com a oxamniquine. É administrado via oral, com dose de 60mg/kg para crianças e 50mg/kg para adultos, ambas em doses únicas. Os efeitos colaterais são leves e passageiros e predominam dor abdominal, cefaléia e sonolência. A droga atua lesando o tegumento do parasito, através de mudanças ultraestruturais, resultando em aumento da permeabilidade aos íons de cálcio. Esses íons se acumulam no citoplasma do parasita, levando a contrações musculares e paralisia do verme adulto. A droga também danifica a membrana do tegumento e, com isso, expõe antígenos-alvo a resposta imune do hospedeiro (BRASIL, 2010; NEVES, 2006). Por ser nacionalmente produzida, em Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz/RJ, o praziquantel é a droga de escolha atual no tratamento da doença (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Todos os pacientes com evidências de infecção, mesmo na ausência de sintomas, devem ser tratados, incluindo imigrantes e viajantes (BRASIL, 2010). Utilizar tratamento quimioterápico é de extrema importância para evitar o aumento da carga parasitária dos pacientes, impedir a evolução da doença para estágios mais avançados, além de proporcionar cura da doença (BRASIL, 2010). Entretanto, estudos com estratégias utilizando novos quimioterápicos são necessários devido ao aparecimento de resistência ao praziquantel (GREENBERG, 2013).

A ausência de conhecimento sobre os mecanismos exatos da ação do praziquantel contribui para a falta de esclarecimento sobre o modo de ação de resistência à droga em *Schistosomas*. Tem sido demonstrado que o surgimento da resistência se deve a sequência de larga escala e ao uso repetido do mesmo quimioterápico. Embora essa resistência seja pouco detectada em campo, uma susceptibilidade reduzida da droga em *S. mansoni* tem sido encontrada em muitos focos endêmicos. Com isso, nessas áreas endêmicas, onde a quimioterapia com o praziquantel é implementada, é de grande importância o desenvolvimento de ferramentas para diminuir ou até mesmo evitar a disseminação dessa resistência (GREENBERG, 2013; WANG *et al.*, 2012).

---

---

---

---

## 2.6 Fibrose hepática na esquistossomose

A reparação tecidual é um processo biológico de fundamental importância, pois representa um mecanismo crucial para a sobrevivência do indivíduo substituindo células e tecidos lesados durante vários estímulos agudos ou crônicos. O processo consiste em duas fases: regeneração e fibrose (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009). A regeneração hepática é caracterizada por um crescimento tecidual organizado e ordenado quando da perda do parênquima, o qual desencadeia um processo regenerativo até a restauração da massa hepática. Essa restauração ocorre por hiperplasia celular compensatória nos lóbulos remanescentes, com consequente aumento em suas dimensões (RAMALHO *et al.*, 1993). A fibrose, inicialmente benéfica, pode evoluir para um processo patogênico levando a remodelação e formação de tecido de cicatrização permanente além de causar falência de órgãos e morte em alguns casos (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

As consequências da fibrose hepática representam a maior causa de mortalidade e morbidade e sua ocorrência se deve a uma variedade de fatores, tais como: uso excessivo de álcool e drogas, alergias crônicas e diferentes agentes infecciosos. Além disso, consiste como uma agressão crônica ao fígado em conjunto com o acúmulo de elementos da matriz extracelular (ECM) - colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas -, o que é uma característica das doenças hepáticas crônicas (JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

A ativação das células estreladas hepáticas (conhecidas também como lipócitos ou células de Ito) é o evento dominante na fibrogênese e consiste na alteração fenotípica dessas células em fibroblastos e em miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos (ANTHONY *et al.*, 2010; FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009). As células estreladas hepáticas constituem as principais estruturas responsáveis pela homeostase do órgão e desempenham um papel central na resposta à lesão hepática (WYNN, 2004, 2007). Elas são responsáveis pela formação da ECM, que é importante para manter a função diferenciada de todas as células residentes no fígado. Porém, com o desenvolvimento do processo fibrótico, ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM hepática (WYNN, 2004, 2007), devido ao acúmulo em excesso de proteínas componentes da matriz extracelular que são produzidas pelos miofibroblastos (BRANDT *et al.*, 2010). O acúmulo de tecido fibroso em decorrência da formação do granuloma pode obstruir o fluxo sanguíneo portal, resultando em hipertensão portal e suas sequelas (esplenomegalia e varizes

---

---

---

---

gastroesofagianas), o que causa morbidade e mortalidade associada com a esquistossomose (BURKE *et al.*, 2009).

A fibrose representa um aspecto importante na esquistossomose e é consequência da reação granulomatosa (resposta imunológica), dirigida contra os ovos do parasita que são depositados no fígado, sendo limitada ao espaço periportal, sem haver comprometimento do parênquima hepático nem progressão para cirrose (BRANDT *et al.*, 2010). Na esquistossomose, grande parte das pesquisas, atualmente se baseia no entendimento da associação entre a resposta imunológica e a formação do granuloma e fibrose hepática (SOUZA *et al.*, 2012). Os granulomas esquistossomóticos estão associados com as células T helper CD4<sup>+</sup> e representam a reação de hipersensibilidade tardia (ABATH *et al.*, 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002). Estudos revelaram que as citocinas do perfil Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) reduzem a patologia associada à fibrose, enquanto que as citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) tem papel crítico na patogênese da doença (FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; WYNN *et al.*, 1995, MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

As principais citocinas reguladoras associadas com a produção de proteínas da matriz extracelular são: TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-13, IL-5, IL-10. Estudos em camundongos e humanos com esquistossomose identificaram o papel anti-fibrótico do IFN- $\gamma$ , através da sua atuação na inibição da produção de ECMP pelas células estreladas. Com isso, ocorreria a síntese de metaloproteinases (MP), aumentando assim, a atividade das colagenases do fígado, além da inibição da síntese dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (DESSEIN *et al.*, 1999; HENRI *et al.*, 2002). Em modelo murino da esquistossomose, as citocinas TGF- $\beta$ , IL-13 e IL-4 são relacionadas com a fibrogênese e estimulam as células estreladas hepáticas a se transformarem em miofibroblastos e exercem o efeito oposto ao IFN- $\gamma$  na síntese das ECMP e TIMPs (CHIARAMONTE *et al.*, 2001).

## 2.7 Imunopatologia da esquistossomose

As respostas humoral e celular são mecanismos extremamente importantes para o entendimento do desenvolvimento da patologia associada com a esquistossomose. A resposta imunológica induzida a partir de infecções produzidas pelo *S. mansoni*, varia de acordo com a evolução parasitária e migração por diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro definitivo (FITTIPALDI, 2006).

No processo inflamatório provocado pelo *Schistosoma mansoni* a lesão típica resulta

---

---

---

---

em uma reação granulomatosa em torno dos ovos que são depositados no sistema venoso portal e ficam retidos em sinusóides hepáticos. Os granulomas são formados por fibras colágenas e células do tipo: linfócitos, macrófagos e eosinófilos, em proporções diferentes e que variam dentre os diferentes órgãos de acordo com a fase da doença. A formação do granuloma é mediada por células T CD4<sup>+</sup> e estudos recentes têm demonstrado o importante papel de citocinas no controle do desenvolvimento da doença (JESUS *et al.*, 2004).

O entendimento da diferenciação celular em linfócitos T CD4<sup>+</sup> tem sido crucial para o entendimento das bases que tornam uma resposta imunológica benéfica ou não para o hospedeiro em resposta aos patógenos (MOSMANN *et al.*, 1997). A ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é realizada pelo reconhecimento de determinantes antigênicos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), na superfície de células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar, principalmente em células T efectoras, chamadas de Th1 e Th2. Esta classificação ocorre de acordo com o padrão de citocinas produzidas por essas células. As citocinas Th1 são responsáveis pela indução de uma reação de hipersensibilidade tardia, através da ativação de uma resposta inflamatória e citotóxica. Por outro lado, as citocinas Th2 são responsáveis pela proliferação de linfócitos B, que estimula a produção de IgE e aumenta o número de eosinófilos e mastócitos. A regulação e a produção dessas respostas Th1 e Th2, ocorre de forma simultânea e a resposta Th1 inibe a resposta Th2 e vice-versa (ABATH *et al.*, 2006; JANEWAY *et al.*, 2007).

Modelos experimentais ilustram de forma clara o envolvimento de células T CD4<sup>+</sup> na resposta a progressão da doença (CHUAH *et al.*, 2014). Em murinos, nos estágios iniciais da infecção ocorre uma resposta imunológica predominante Th1, contra a migração dos esquistossômulos e das formas imaturas adultas. Essa resposta é caracterizada pelo aumento da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12. Porém, no momento da oviposição, ocorre uma imunomodulação, onde predomina uma resposta Th2, aumentando níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (BURKE *et al.*, 2009; CHUAH *et al.*, 2014).

A resposta Th2 alcança o pico em aproximadamente 6 a 8 semanas pós infecção e então é modulada com a progressão da doença (BURKE *et al.*, 2009; CHUAH *et al.*, 2014). Essa resposta Th2 é caracterizada pelo aumento de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. Em murinos, essas citocinas do perfil Th2 têm importante função na formação do granuloma, na presença de eosinófilos e no desenvolvimento da fibrose (JESUS *et al.*, 2004). A infecção progride para uma fase mais crônica e ocorre uma regulação desse perfil Th2 (mais ou menos na 12<sup>a</sup> semana) juntamente com uma redução no tamanho do granuloma hepático. Essa imunomodulação regula o equilíbrio das respostas Th1/Th2, sendo acionada por IL-10 e TGF-

---

---



---

---

$\beta$ , que induzem células Treg (CHUAH *et al.*, 2014).

Um estudo utilizando modelo murino deficiente em IL-4 e IL-13 demonstrou que a IL-4 está relacionada com a resposta granulomatosa, e identificou a participação da citocina pró-fibrótica IL-13 no desenvolvimento da fibrose hepática na esquistossomose (FALLON *et al.*, 2000). Estudos de Chiaramonte *et al.* (1999) e Fallon *et al.* (2000) demonstraram o papel da IL-13 como principal citocina mediadora da fibrose na esquistossomose murina (juntamente com IL-4 e TGF- $\beta$ ) através de estímulos para a produção de colágeno *in vitro* por fibroblastos. Em contraste, no mesmo estudo, citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12), exibiam atividades anti-fibróticas, sendo o IFN- $\gamma$ , o principal associado com a redução da deposição de colágeno na cicatrização normal e no processo de fibrose (FALLON *et al.*, 2000).

Estudos recentes em murinos têm revelado um papel da citocina IL-17 e das células T regulatórias (Treg) na infecção pelo *Schistosoma*. Assim, estudos relacionados com a diferenciação de células Treg e a citocina IL-17, têm demonstrado um *link* entre essas respostas na qual, a Treg diminuiria o desenvolvimento da doença (sendo associada com a sobrevivência do parasito), enquanto a IL-17 aumentaria a progressão da mesma. Foi relatado que o mecanismo utilizado por essa citocina estaria relacionado com o recrutamento de granulócitos (eosinófilos, no caso da esquistossomose) e isso contribuiria para o desenvolvimento de danos nos tecidos e fibrose (SOUZA *et al.*, 2012; MBOW *et al.*, 2013).

Durante o processo de infecção em humanos, o perfil de produção de citocinas está relacionado com as diferentes formas clínicas da esquistossomose (MORAIS *et al.*, 2008). Existem evidências de que citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) sejam responsáveis pela gênese da fase aguda. A resposta imunológica observada em pacientes nessa fase, durante a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semana, é uma associação na expressão de citocinas do tipo Th1 e Th2, com predomínio, porém, das citocinas Th1, onde são vistos níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-5 e baixos de IL-10. Ocorre elevação também do número de eosinófilos e na produção de IgE (CALDAS *et al.*, 2008). Montenegro *et al.* (1999) observaram uma produção elevada de IFN- $\gamma$  na fase inicial da doença e que a IL-10 tem papel fundamental na supressão da resposta imune tanto na infecção aguda, como na crônica.

Com o desenvolvimento da fase crônica, os pacientes, nas formas EI/EHI apresentam ambas as respostas, Th1/Th2, com predominância de citocinas Th2, com altos níveis de IL-4 e IL-5. Após a oviposição, ocorre um aumento de IFN- $\gamma$  e IL-2 (ABATH *et al.*, 2006; BURKE *et al.*, 2009). Não existem relatos na literatura sobre a imunopatologia associada com a forma hepática. No entanto, os perfis de citocinas relatado em pacientes com EHE são mais variáveis. Esses pacientes têm uma baixa resposta Th2 associada com aumento na produção

---

---

---

---

de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e diminuição da IL-5 e IL-10, após estímulo com SEA e SWAP, o que leva ao desenvolvimento de uma resposta imunológica predominantemente pró-inflamatória (BURKE *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2008). Em contraste, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos de TNF- $\alpha$  contra SEA, níveis elevados de IL-4 contra preparação de SWAP e altos níveis de IL-10 contra SEA e SWAP também estão sendo associados com risco de desenvolvimento da forma hepática severa da doença (BURKE *et al.*, 2009). Abath *et al.* (2006) identificaram que pacientes com a forma mais grave da doença apresentavam resposta predominante Th2 e não conseguiam desenvolver uma resposta Th1 significativa. Em indivíduos nos estágios iniciais do desenvolvimento da hepatoesplenomegalia também foi demonstrada uma relação no perfil de citocinas Th2 com a fibrose periportal severa (MAGALHÃES *et al.*, 2004).

Existem estudos que relatam que durante a fase aguda, a resposta imune do hospedeiro contra os antígenos dos ovos é mais intensa do que na fase crônica da infecção, e isso acontece porque durante a fase crônica ocorre uma diminuição na produção das citocinas Th2, ao mesmo tempo em que se verifica um rápido aumento na produção das citocinas Th1. Essa transição no perfil de citocinas produzidas leva a uma diminuição do tamanho dos granulomas recentemente formados, ocasionando uma imunomodulação. Porém, a contínua formação de granulomas no parênquima hepático pode acarretar no desenvolvimento de fibrose severa, ocasionada por uma elevação na resposta Th2 (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Em síntese, nos seres humanos, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de TNF- $\alpha$  (sugerindo sua participação na formação do granuloma) estão associados com a presença de fibrose periportal avançada (HENRI *et al.*, 2002).

### 2.7.1 Interferon $\gamma$

O IFN- $\gamma$  é produzido por células natural killer (NK), T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Essa citocina possui importantes funções na imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares, atuando em antagonismo com as funções do TGF- $\beta$  através da inibição da sua ativação, impedindo a fosforilação e da transdução de sinais dessa citocina. O efeito final do IFN- $\gamma$  é inibir reações com predominância de eosinófilos dependentes de IgE e, ao mesmo tempo, promover reações ativando macrófagos para destruir células infectadas (WYNN; RAMALINGAM, 2012). Na esquistossomose, através da inibição da diferenciação de células estreladas hepáticas, o IFN- $\gamma$  exerce um papel importante na regulação de fibroblastos e na síntese de colágeno, e conseqüentemente a produção de matriz extracelular. Também é responsável por aumentar a atividade de colagenases do fígado, pela inibição da síntese de

---

---

TIMPs e pelo estímulo da síntese de MP (HENRI *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  foi demonstrado como sendo a principal citocina antifibrótica (OLIVEIRA *et al.*, 2006), já que casos de fibrose periportal severa foram associados com baixos níveis de IFN- $\gamma$  (HENRI *et al.*, 2002; TALLAT *et al.*, 2007) e que em modelos murinos, o IFN- $\gamma$  inibe a deposição de colágeno (STAVITSKY, 2004).

### 2.7.2 Interleucina 4 e Interleucina 13

A IL-4 é expressa por células Th2, porém a mesma pode ser produzida em menores quantidades por células Th1 (VARELLA *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2008). A citocina IL-13 é produzida principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, mas outras células, incluindo T CD8<sup>+</sup> e células NK-T, basófilos e eosinófilos também podem produzi-la (ABBAS, 2010).

Por compartilharem o mesmo complexo receptor, as duas citocinas possuem funções semelhantes. A IL-4 possui como principal atividade determinar o perfil da resposta imunológica Th2, além de induzir a proliferação da diferenciação de células B e aumentar a expressão de Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II (possibilitando assim uma maior ativação de Th2). Ela ainda estimula a produção de IgE nas células B ativadas e aumenta a expressão de receptores para essa imunoglobulina em mastócitos e basófilos. A IL-4 tem seu efeito antagonizado pelo IFN- $\gamma$ . Um estudo em camundongos infectados com *S. mansoni* e deficientes de IL-4R e via STAT6 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 6) demonstrou uma diminuição do desenvolvimento do granuloma, sugerindo um papel da IL-4 e IL-13 na resposta granulomatosa. Porém com o bloqueio da IL-13, não houve alteração do granuloma, indicando que, apenas a IL-4 participa dessa etapa (VARELLA *et al.*, 2001).

A IL-13 foi inicialmente reconhecida pelos seus efeitos sob monócitos e células B, onde ela também regulava a expressão de MHC classe II, além de promover a troca da classe IgE e inibir a produção de citocinas inflamatórias. Essa citocina também está associada com a regulação de receptores de quimiocinas e produção de muco. O IFN- $\gamma$  também é antagonista dessa citocina (ZHENG *et al.*, 2008).

Finalmente, a IL-13 foi revelada como um potente mediador do processo fibrogênico em esquistossomose e asma, os quais indicam o seu papel regulador chave na matriz extracelular (LIU *et al.*, 2012; MENTINK-KANE *et al.*, 2011). Além disso, diferentes estudos sugerem que esta citocina estimule a produção de TGF- $\beta$ . Através de múltiplos tipos celulares, a IL-13 induz a produção de arginase-1 em macrófagos e, essa enzima utiliza a L-

---

---

arginina como substrato para produzir a L-ornitina. Esse aminoácido serve como substrato para a produção de ornitina descarboxilase e ornitina amino-transferase, os quais são responsáveis pela produção de poliaminas e prolinas, respectivamente. A prolina é um aminoácido essencial para a produção de colágeno e, conseqüentemente, no desenvolvimento de fibrose (WYNN, 2003, 2007).

### 2.7.3 Receptores da IL-4 e IL-13

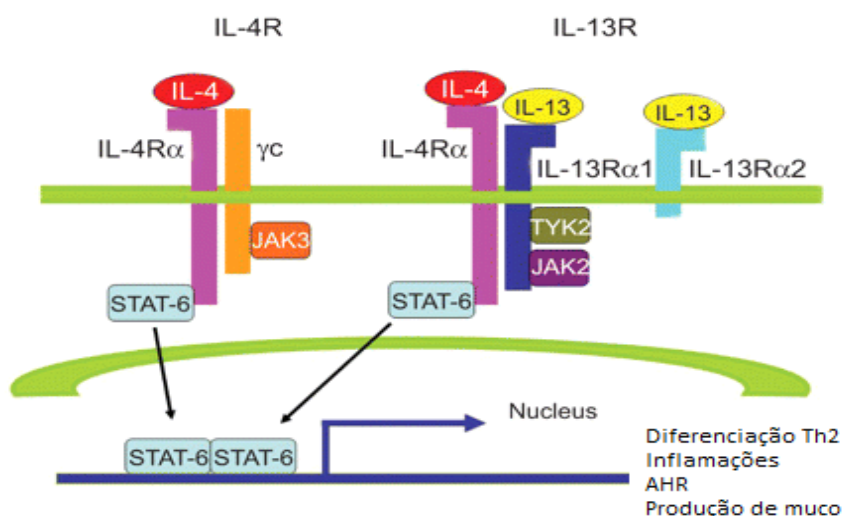
A IL-13 possui dois receptores, dentre os quais um se liga com baixa afinidade a essa citocina (IL-13R $\alpha$ 1) e outro que se liga com alta afinidade (IL-13R $\alpha$ 2). A IL-13 medeia seus efeitos através da ligação a um complexo receptor constituído por IL-4R $\alpha$  (comum para a IL-13 e IL-4) e pelo receptor, IL-13R $\alpha$ 1 (figura 6). No primeiro momento, a IL-13 se liga ao IL-13R $\alpha$ 1, com baixa afinidade, e em seguida, ocorre a ligação com o IL-4R $\alpha$  gerando um heterodímero de alta afinidade de ligação (complexo receptor tipo II). A IL-4 também se liga a esse complexo de receptores e isso pode justificar a sobreposição de funções existentes entre essas duas citocinas. Porém, a IL-4 também se liga a receptores do tipo I (compostos por IL-4R $\alpha$  e cadeias  $\gamma$ ) (QASEEM *et al.*, 2013).

Na presença da IL-4 e da IL-13, ocorre uma sinalização exclusiva para ambas as citocinas, via STAT6, que é mantida através de transdutores de sinal e ativadores da transcrição (Jak). A ativação de Jak resulta na fosforilação de tirosinas citoplasmáticas, em IL-4R, que recrutam STAT6. Com isso, a STAT6 é então fosforilada e ativada, o que leva a sua associação com promotores de IL-4 e IL-13, que, em seguida, conduzem para o núcleo onde ocorre transcrição, diferenciação de células Th2 (QASEEM *et al.*, 2013).

Outra cadeia de receptor tem sido descrita, a IL-13R $\alpha$ 2, que se liga exclusivamente a IL-13 com alta afinidade. A ligação da IL-13 com esse segundo receptor, diminui a disponibilidade da citocina no meio, reduzindo a sinalização da citocina com o complexo IL-4R/IL-13R $\alpha$ 1. Porém, se os níveis de IL-13 aumentarem, essa inibição deixa de acontecer (MANNON; REINISCH, 2012; QASEEM *et al.*, 2013).

---

---

**Figura 6-** Receptores da IL-4 e IL-13 e vias de sinalização

Fonte: Holgate (2012)

#### 2.7.4 Receptor $\alpha 2$ da IL-13 (IL-13R $\alpha 2$ )

O IL-13R $\alpha 2$  se encontra ligado à membrana, no citoplasma ou solúvel (WYNN, 2003; ZHENG, 2008). Esse receptor é expresso em basófilos e em diversas células: endoteliais, epiteliais, epiteliais respiratórias, fibroblastos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e células B (DAINES *et al.*, 2002; OGATA *et al.*, 1998; TABATA; HERSHEY, 2007; YOSHIKAWA *et al.*, 2003).

O IL-13R $\alpha 2$  é uma proteína de 380 aminoácidos com um padrão de consenso (dois pares de cisteínas conservadas na porção amino-terminal), característica de receptores da família de citocinas hematopoiéticas (receptor da citocina tipo I). A porção intracelular consiste de um domínio citoplasmático contendo apenas 17 aminoácidos (cauda curta). Existem relatos de ligação do receptor com sinais intracelulares (STAT3, PI3-K E MAPK) porém ainda não está claro se esse mecanismo ocorre de forma direta ou através da ligação adicional de alguma proteína (DAVID *et al.*, 2001; MANNON; REINISCH, 2012; PANDYA *et al.*, 2010).

A expressão desse receptor é regulada em resposta a citocinas Th2 (IL-4, IL-13, IL-10) e IFN- $\gamma$  (DAINES *et al.*, 2002; SIVAPRASAD *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2003). O IL-13R $\alpha 2$  atua controlando a via de sinalização da IL-4 em queratinócitos (ZHENG *et al.*, 2003), e é um potente inibidor da citocina IL-13 (WILSON *et al.*, 2007), porém seus mecanismos de ação ainda não são totalmente conhecidos.

Uma hipótese é a de que esse receptor, presente na superfície das células, dispute com o complexo IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha 1$  pela ligação da IL-13, reduzindo a disponibilidade da citocina

---

---

no meio. Tem sido relatado também que a ligação desse receptor com a IL-13 causa uma internalização do complexo IL-13/13R $\alpha$ 2 e isso ocasiona uma modulação na resposta dessa citocina (através da não ativação da via STAT6), limitando também sua disponibilidade no meio, além de diminuir a ativação de receptores presentes na superfície celular (ANDREWS *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2003).

A forma solúvel do receptor é um importante regulador de inflamações e atua como um modulador endógeno para a sinalização de citocinas. Essa forma tem sido relatada atuando nas respostas da IL-13, através da ligação e neutralização dessa citocina (TABATA; HERSHEY, 2007). O receptor também atuaria bloqueando a produção de colágeno, diminuindo a progressão da fibrose estabelecida em determinadas doenças (WILSON *et al.*, 2007; WOOD *et al.*, 2003).

Citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ) também têm sido relatadas na mobilização para a superfície de estoques intracelulares desse receptor em cultura de células, e isso poderia controlar respostas celulares induzidas por IL-13. Estudos observaram que o IFN- $\gamma$  estimularia a produção do IL-13R $\alpha$ 2, através da ativação de macrófagos, inibindo cronicamente respostas induzidas por IL-13 em células e tecidos. O mesmo estudo revelou que o IFN- $\gamma$  também atuaria na inibição da expressão de IL-13R $\alpha$ 1, reduzindo a formação do complexo IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1, e assim, diminuiria a IL-13 e a via de sinalização de IL-4 (ZHENG *et al.*, 2003).

Estudos de fragmentos de pulmão em camundongos transgênicos com loci nulos para IL-13R $\alpha$ 2, indicaram uma remodelação e inflamação pulmonar induzida por IL-13 ou ovalbumina. O receptor atuaria atenuando eficazmente a eotaxina induzida por IL-13 e a fosforilação do STAT6 em fibroblastos (ZHENG *et al.*, 2008).

Um estudo com camundongos infectados com *S. mansoni* e deficientes para esse receptor, demonstraram um aumento da fibrose hepática e isso foi atribuído a uma atividade aumentada da IL-13. Tratamento com IL-13R $\alpha$ 2 nesses camundongos foi demonstrado como ser capaz de reverter esse fenótipo pró-fibrótico do animal, através da modulação da atividade da IL-13 na matriz extracelular (WOOD *et al.*, 2003). Em contraste, o receptor pode atuar contribuindo na resposta pró-fibrótica ocasionada por TGF- $\beta$ . Porém, a fibrose mediada por IL-13 na infecção pelo *S. mansoni* é independente de TGF- $\beta$  (SIVAPRASAD *et al.*, 2010).

Outro estudo em camundongos infectados cronicamente e deficientes em IL-13R $\alpha$ 2 revelou uma exacerbação granulomatosa e uma impossibilidade de supressão da resposta inflamatória na fase crônica da infecção, demonstrando um papel importante desse receptor na regulação das inflamações. Além disso, esses camundongos também desenvolveram fibrose

---

---

---

---

hepática grave, hipertensão portal, sucumbindo à infecção de maneira acelerada (WYNN, 2004). Assim, o IL-13R $\alpha$ 2 foi considerado um mediador crítico na imunomodulação da fibrose periportal (MENTINK-KANE *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2008).

---

---

### 3 JUSTIFICATIVA

Estudos revelaram que citocinas do perfil Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) reduzem a patologia associada à fibrose, enquanto que citocinas do perfil Th2 tem papel crítico na patogênese da esquistossomose, aumentando a patologia associada à fibrose. A IL-13 foi revelada como um potente mediador do processo fibrogênico em esquistossomose, sendo a principal citocina pró-fibrótica, enquanto que o IFN- $\gamma$  foi demonstrado como a principal citocina antifibrótico. Os mecanismos de controle da atividade da IL-13 estão ligados aos receptores desta citocina (FALLON *et al.*, 2000; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

Estudos tem relacionado o IL-13R $\alpha$ 2 como um importante regulador da resposta imune em diversas doenças, como asma, alergias e inflamações pulmonares (MENTINK-KANE *et al.*, 2004). Porém, os mecanismos de regulação desse receptor ainda não foram totalmente esclarecidos na esquistossomose humana e elucidar os mecanismos protetores desse receptor e o seu papel na inibição da fibrose do tecido, mediada pela IL-13, contribuirá no entendimento do processo de respostas inflamatórias mediadas por células Th2 (CHIARAMONTE *et al.*, 2004). Sendo assim, até onde sabemos, nosso estudo é pioneiro na avaliação do IL-13R $\alpha$ 2 relacionando-o com o processo de fibrogênese hepática na esquistossomose.

A avaliação da produção do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 do estudo em resposta a antígenos de ovo do *S. mansoni* em cultura e a associação dos níveis do IL-13R $\alpha$ 2, IL-13 e IFN- $\gamma$  com os diferentes graus de fibrose periportal e diferentes formas clínicas contribuirá na geração de conhecimento sobre o desenvolvimento de novas imunoterapias para os pacientes portadores da doença.

---

---



---

---

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar os níveis do receptor antagonista de IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) e da resposta imune celular na esquistossomose mansônica.

### 4.2 Específicos

- a) Padronizar o Human DuoSet ELISA IL-13R $\alpha$ 2
  - b) Caracterizar o perfil sócio-epidemiológico, clínico e laboratorial dos pacientes incluídos no estudo;
  - c) Avaliar a produção do IL-13R $\alpha$ 2, das citocinas de perfil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e de perfil Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) após estímulo com antígenos de ovo do *S. mansoni* em cultura de células sanguíneas;
  - d) Correlacionar os níveis do receptor e das citocinas Th1 e Th2 entre si e com os diferentes graus de fibrose periportal e diferentes formas clínicas.
- 
-

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Desenho do estudo

O desenho de estudo foi do tipo corte transversal com grupos de comparação interna, no qual as medições são realizadas em um único momento, não existindo período de seguimento dos pacientes (BASTOS; DUQUIA, 2007).

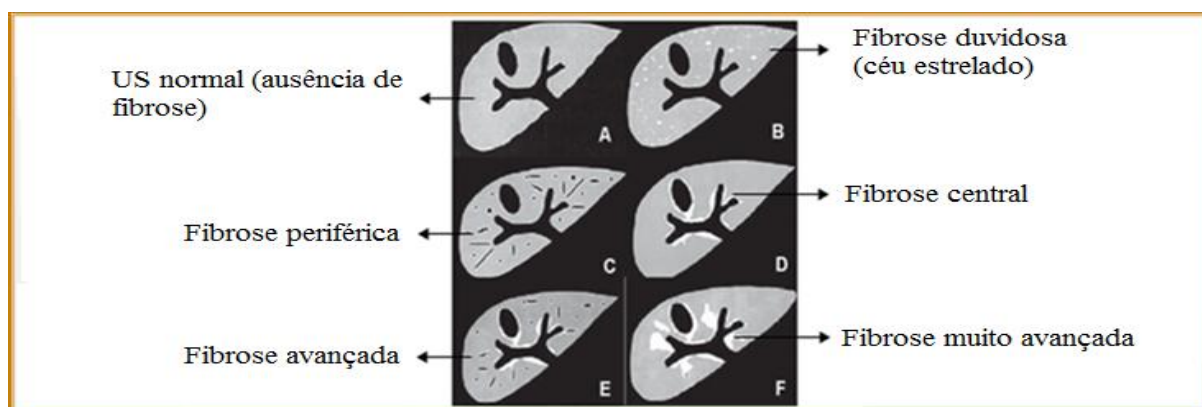
### 5.2 População de estudo

Pacientes com esquistossomose mansônica de ambos os sexos com idade entre 18 a 65 anos foram selecionados, por demanda espontânea, no período de agosto a dezembro de 2013, no ambulatório de Esquistossomose do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), através da história epidemiológica, exame clínico, ultrassonografia abdominal e parasitológico de fezes.

Os resultados de exame clínico, US, parasitológico de fezes, de realização de tratamento com Praziquantel, contagem de plaquetas, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ GT), foram retirados de informações do prontuário de cada paciente.

Os pacientes tiveram a confirmação da presença ou não da fibrose periportal através da ultrasonografia abdominal utilizando a classificação de Níamey (RICHTER *et al.*, 2001). Essa classificação caracteriza a fibrose periportal em seis padrões: A – ausência; B – duvidosa (céu estrelado); C – periférica; D – central; E – avançada; F – muito avançada (figura 7).

**Figura 7-** Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Níamey



Fonte: Adaptado de Richter *et al.* (2001)

Os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com o padrão de fibrose periportal. O grupo 1 foi denominado controle, sendo formado por pacientes esquistossomóticos (confirmados através do parasitológico de fezes) sem desenvolvimento de fibrose periportal, portanto, com padrões A e B.

O grupo 2 foi constituído por pacientes com fibrose estabelecida e denominado caso. Porém, esse grupo foi subdividido em 2 categorias, da seguinte forma: FPP moderada (pacientes com padrões C e D) e FPP avançada (padrões E e F).

Além disso, os pacientes foram caracterizados nas diferentes formas clínicas da doença, após exame ultrassonográfico e clínico, em EHI, EH (forma leve), EHE (forma grave) (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

Foram critérios de exclusão para a seleção dos pacientes aqueles que apresentavam hepatopatias de outras etiologias, como hepatite B ou C, uso de imunossupressores, transplante de fígado, pacientes esplenectomizados, com doença renal crônica, com HIV e consumo de álcool > 210 g/semana em homens ou 140 g/semana em mulheres (ANGULO, 2002).

### **5.3 Cálculo Amostral**

Uma média de 600 pacientes tem o diagnóstico confirmado para esquistossomose mansônica no ambulatório de esquistossomose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no período de 01 ano. A prevalência para esta doença é 60% neste ambulatório.

Para o cálculo de amostra foi utilizado um percentual de exposição de 30% entre os controles, uma Odds Ratio (OR) mínima de 3,5, um risco de 5%, poder de 80% e uma razão de 0,4 (2,5 casos para cada controle) (BARRETO, 2011). Com isso, chegamos ao resultado de 86 casos e 34 controles, totalizando 120 pacientes no período de estudo.

### **5.4 Antígenos e mitógenos**

#### *5.4.1 Preparação de antígeno SEA*

Para obtenção desse antígeno, segundo Gazzinelli *et al.* (1983), fígados foram removidos de camundongos albinos Swiss outbred, segmentados e embebidos em *phosphate buffer saline* (PBS), pH 7.2 por 24 horas a 4°C. Após essa etapa, foram submetidos a banho-

---

---

---

---

maria 37°C, triturados e filtrados através de membrana de 0,45- $\mu$ m (Milipore, New Haven, CT).

Os antígenos obtidos foram dosados através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio a 10% de acordo com Laemmili (1970) e corados pelo Comassie Blue (SILVA, 2008).

#### 5.4.2 Utilização dos antígenos e mitógenos

O SEA foi utilizado para estimular as culturas de células numa concentração final de 20  $\mu$ g/ml (MORAIS *et al.*, 2008).

O acetato de miristato forbol (PMA, 50  $\mu$ g/ml) e ionomicina (Iono, 1  $\mu$ g/ml, Calbiochem Burlingame, CA, USA) após demonstrar eficácia quanto aos resultados, foram utilizados associados para a estimulação mitogênica de culturas.

### 5.5 Padronização do DuoSet ELISA IL-13R $\alpha$ 2

Para a padronização do DuoSet ELISA IL-13R $\alpha$ 2 R&D Systems foram realizados 15 experimentos, no período de março/2013 a agosto/2013. Foram avaliados: o tipo de substrato para revelação dos resultados, a água para o preparo dos reagentes, albumina do soro bovino (BSA) para preparo do reagente diluente, temperatura de incubação das amostras e o tipo de placa. Os melhores parâmetros foram definidos através da qualidade da curva produzida pelo experimento.

Primeiramente, foram avaliados quatro diferentes substratos para revelação dos resultados: ABTS Sigma (lote 119K144), ABTS Sigma (lote 050785), TMB (BD) e TMB (R&D Systems). Após resultados, o TMB (R&D Systems) foi selecionado.

A água utilizada para o preparo dos reagentes (PBS, PBS/Tween-20 e PBS/BSA) também foi avaliada, sendo testadas dois tipos: destilada (sugerida pelo protocolo do ELISA) e ultra-pura. Após nossos experimentos foi selecionada a Milli-Q.

Dois BSAs foram testados: lote 22K1266, Sigma e lote 017K0775, Sigma e de acordo com os resultados obtidos, o BSA (lote 017K0775 Sigma) foi utilizado.

A temperatura de incubação das amostras também foi avaliada, utilizando a temperatura ambiente (T.A.) e 8°C a 10°C e após resultados, foi fixada a temperatura ambiente para realização dos experimentos. O último parâmetro avaliado foi o tipo de placa

---

---

---

---

utilizada para leitura do ELISA, sendo testado a placa tipo Corning (lote 25805-96) e a Immulon 4 (ThermoLabsystems). Após resultados a placa Immulon 4 foi selecionada.

### 5.5.1 Determinação do melhor tempo de produção do IL-13R $\alpha$ 2

Três indivíduos não-infectados (saudáveis) e três indivíduos portadores de esquistossomose mansônica (com a forma hepatoesplênica da doença) foram selecionados para estabelecer o tempo adequado de cultivo para a detecção do IL-13R $\alpha$ 2. Setecentos microlitros de sangue total (MORAIS *et al.*, 2008) foram depositados em duplicata em poços de placa de cultura e estimulados com PMA/IONO, SEA e sem estímulo (controle negativo). A placa foi incubada a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e os sobrenadantes da cultura celular foram coletados nos tempos de 6, 12, 24, 36 e 48 horas, de acordo com Chen *et al.* (2013).

## 5.6 Preparação celular e dosagem de citocinas

O sangue total (5 ml), coletado em tubo vacutainer com heparina (MONTENEGRO *et al.*, 1999), foi cultivado em meio RPMI 1640 contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As placas de cultura foram estimuladas com SEA, PMA/Iono, além de ter um controle sem estímulo. As culturas foram então, incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida e os sobrenadantes coletados em tempo determinado de acordo com a cinética realizada para o receptor e um tempo de 96h, para as citocinas IL-13, IFN- $\gamma$  (MORAIS *et al.*, 2008), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  e em seguida armazenado a -70°C para posterior realização de ELISA e CBA.

## 5.7 Detecção do IL-13R $\alpha$ 2 por ELISA

A detecção dos níveis do IL-13R $\alpha$ 2 nos sobrenadantes de cultura dos pacientes selecionados no estudo, foi realizada através do Human IL-13 R alpha 2 DuoSET seguindo a metodologia: anticorpos monoclonais de camundongo anti-humano IL-13R $\alpha$ 2 (4µg/ml) foram utilizados para sensibilizar as placas Immulon 4 “overnight”. Na próxima etapa, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20, 0,05% (PBST), bloqueadas com PBS/bovine serum albumin (BSA Sigma lote 017K0775) 1% (Reagente Diluente) e colocadas a 37°C por 1 hora. Após lavagens, os sobrenadantes de cultura em duplicata correspondendo a cada paciente foram colocados na placa e mantidos a 37 °C por 2h. Após esta etapa, as placas foram lavadas e

---

---

---

---

os anticorpos biotinizados anti-humano IL-13R $\alpha$ 2 (300ng/mL) foram adicionados por 2h a 37 °C. Posteriormente e após lavagem novamente das placas, o conjugado peroxidase-estreptavidina (1:1000 por 20 minutos a 37 °C) foi acrescentado aos poços da placa e em seguida o substrato Tetrametilbenzidina (TMB) R&D Systems foi usado para detectar o anticorpo biotinizado. A concentração do IL-13R $\alpha$ 2 na amostra foi determinada a partir da diluição seriada do recombinante humano IL-13R $\alpha$ 2 Fc/chimera. A curva padrão foi formada por 8 pontos em duplicata utilizando fator de diluição 2, sendo o ponto da curva de maior concentração foi de 20.000 pg/ml e o de mais baixa concentração foi de 156,5 pg/ml, além de dois poços sem padrões ou amostras de pacientes, que foram denominado branco. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, onde o comprimento de onda duplo utilizado foi de 450/595nm. Os anticorpos e padrões utilizados nesse ensaio foram obtidos pela R & D Systems.

### **5.8 Detecção do IL-13 e IFN- $\gamma$ por ELISA**

As citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$  foram quantificadas no sobrenadante de cultura dos pacientes selecionados, através de ELISA, com o *kit* Quantikine (R&D Systems<sup>®</sup>), seguindo as instruções do fabricante.

Os *kits* contêm placas de poliestireno de 96 poços pré-sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas específicos. Os padrões foram preparados através da reconstituição das citocinas recombinante liofilizadas, resultando em soluções estoque de concentração definida (4000 pg/ml para o IL-13 e 1000 pg/ml para o IFN- $\gamma$ ). A curva padrão foi composta por 6 pontos em duplicatas com fator de diluição 2, sendo o ponto da curva de maior concentração de 4.000 pg/ml para IL-13 e 500 pg/ml para IFN- $\gamma$ , sendo o ponto da curva de menor concentração de 125 pg/ml para IL-13 e 15,6 pg/ml para o IFN- $\gamma$ . Foram adicionados nas placas, em seus respectivos poços, padrões, amostras dos pacientes em duplicata e poços sem padrões ou amostras de pacientes, que foi denominado branco. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 2 horas, sendo posteriormente lavadas com solução tampão. Após essa etapa, foram adicionados anticorpos policlonais conjugados à enzima peroxidase, específicos para as respectivas citocinas. As placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 2 horas e após nova lavagem, foi adicionada a solução de substrato TMB e as placas serão incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionada uma solução (ácido sulfúrico 2N) para interromper a reação. A intensidade da cor produzida foi medida em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda duplo de 450/595nm. As leituras e os

---

---

---

---

cálculos das concentrações referentes às dosagens das diferentes citocinas foram realizados com o *software* Microplate Manager, versão 4.0 (Biorad laboratories).

### **5.9 Detecção de citocinas Th1/Th2 por Cytometric Bead Array usando citômetro de fluxo**

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram quantificadas no sobrenadante de cultura dos pacientes selecionados, através de Citometria de fluxo (CBA-Cytometric Bead Array), com o *kit* BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, seguindo as instruções do fabricante, no citômetro BD FACSCalibur. Esse citômetro é um analisador analógico equipado com dois lasers com a capacidade de análise multicolor padrão (até 4 cores). O laser principal é lido em um comprimento de onda de 488nm, enquanto o laser secundário é lido em 635nm.

O kit CBA (BD) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Th1) e IL-4, IL-6, IL-10 (Th2) em uma mesma amostra. Seis populações de beads com intensidades de fluorescências distintas foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturados para formar o CBA e lidos no canal FL4 do citômetro de fluxo. As populações de cada bead foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as beads de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio. Os tubos foram preparados utilizando 25 $\mu$ l da amostra, 30 $\mu$ l da mistura de beads e 25 $\mu$ l do anticorpo de detecção (Human Th1/Th2 – II PE Detection Reagente). O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção da curva padrão (que continha 10 tubos, incluindo o tubo sem amostra ou padrão, denominado branco). Os tubos foram então, homogeneizados e incubados por 3 horas, em temperatura ambiente, no escuro. Após essa etapa, foram adicionados 0,5ml de Wash Buffer em cada tubo e todos foram centrifugados por 5 minutos em 200g. Os sobrenadantes de cada tubo foram então descartados e foi adicionado 300 $\mu$ l de Wash Buffer para ressuspender o pellet bead de cada tubo. E os resultados foram obtidos através de gráficos e tabelas utilizando o software FCAP.

### **5.10 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada através do GraphPad Prism versão 6, considerando um valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Foi realizada uma

---

---

análise descritiva para expor os resultados obtidos nas dosagens das citocinas. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo e mediana. Os dados relativos aos níveis de citocinas foram testados quanto à normalidade usando o teste Shapiro-Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado Teste t-student quando observado o pressuposto de normalidade. Quando não observado o pressuposto, os testes utilizados foram Mann-Whitney (para comparação de dois grupos) e Kruskal-Wallis (para comparação de 3 grupos).

Para correlacionar os níveis do receptor IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 entre si foi utilizados o teste de Spearman. O coeficiente de correlação de postos de Spearman é denominado pela letra grega  $\rho$  (rho) e é usado para análise de dados não-paramétricos (WAYNE, 1995).

---

---



## **6 ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM obtendo aprovação, com parecer de n. 15/12 e registro no CAAE: 04304912.8.0000.5190 (ANEXO).

Os pacientes do grupo caso e do grupo controle envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, após leitura e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (APÊNDICE A), segundo a resolução CNS 196/96. Dados dos prontuários desses pacientes e resultados de exame como ultrassonografia foram coletados e armazenados em formulário de pesquisa específico (APÊNDICE B).

---

---

---



---

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Características sócio demográficas, epidemiológicas e clínicas

Nesse estudo foram incluídos 74 pacientes portadores da esquistossomose mansônica, sendo 7 com padrão de fibrose A (grupo controle), 43 com padrão C+D (grupo caso) e 24 com padrão E+F (grupo caso). Pacientes esquistossomóticos com o padrão B de fibrose não foram encontrados. Na classificação dos pacientes quanto à forma clínica foram incluídos 24 pacientes com a forma EHI, 7 com a forma EH e 43 com a forma EHE. Quanto à idade, observou-se que a mediana dos pacientes foi de 53,5 anos, com variação de 18 a 65 anos.

Os pacientes do grupo controle apresentaram uma mediana de idade de 60 anos e os pacientes dos grupos caso apresentaram medianas de 52 e 51 anos, padrão de fibrose C+D e E+F, respectivamente. Essa diferença de medianas não foi estatisticamente significativa ( $p=0,3160$ ). A maioria dos pacientes era do sexo feminino (64,87%) em ambos os grupos controle e caso.

Ao classificar os pacientes pela faixa etária, observou-se que 18,92% (14/74) estavam com idade entre 18-39 anos, 56,76% (42/74) entre 40 e 59 anos e 24,32% (18/74) acima de 60 anos (tabela 1).

**Tabela 1-** Características demográficas e epidemiológicas de pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013

Variáveis	n	A	C+D	E+F
n pacientes	74	7	43	24
		<b>IDADE</b>		
Mediana (%)	53,5	60	52	51
		<b>SEXO</b>		
Masculino (%)	35,13	28,57	27,91	50
Feminino (%)	64,87	71,43	72,09	50
		<b>FAIXA ETÁRIA</b>		
18-39 (%)	18,92	0	16,28	29,17
40-59 (%)	56,76	42,85	60,46	54,17
>60 (%)	24,32	57,15	23,26	16,66

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco - n= número de pacientes; n= número de pacientes; A= padrão de fibrose A; C+D= padrão de fibrose CD; E+F= padrão de fibrose EF

O grau de instrução foi avaliado de acordo com o último ano cursado pelos pacientes. O resultado demonstrou que 7 (9,46%) pacientes não tinham nenhum grau de escolaridade, 47 (63, 51%) tinham o ensino fundamental incompleto, 6 (8, 11%) tinham o ensino fundamental

---



---

completo, 1 (1,35%) tinha o ensino médio incompleto e 13 (17,57%) tinham o ensino médio completo (tabela 2).

A renda familiar foi estimada a partir do número de salários mínimos obtidos por todos os moradores que trabalhavam no domicílio dos pacientes. Com isso, 14,87% (11/74) possuíam renda inferior a um salário mínimo, 67,57% (50/74) possuíam renda entre 1 a 2 salários, 10,81% (8/74) recebiam entre 3 a 4 salários, 2,70% (2/74) possuíam uma renda superior a 4 salários mínimos e 4,06% (3/74) pessoas não quiseram responder (tabela 2).

A situação trabalhista dos pacientes também foi questionada e observou-se que a maioria destes estavam empregados (40,54%), principalmente exercendo atividades de agricultores e pedreiros. Um percentual de 28,38% estava desempregado e 21,62% dos pacientes estavam aposentados por idade. Um pequeno percentual, (8,11% e 1,35%) era do lar e estudante, respectivamente, e podem ser observados na tabela 2.

**Tabela 2-** Grau de escolaridade, renda familiar e situação trabalhista dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013

		<b>Característica</b>				
		<b>ESCOLARIDADE</b>				
		Nenhum	EFI	EFC	EMI	EMC
%		9,46	63,51	8,11	1,35	17,57
		<b>RENDA FAMILIAR</b>				
		Não respondeu	< 1	1 a 2	3 a 4	>4
%		4,06	14,87	67,57	10,81	2,7
		<b>SITUAÇÃO TRABALHISTA</b>				
		Empregado	Desempregado	Aposentado	Do lar	Estudante
%		40,54	28,38	21,62	8,11	1,35

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco – EFI= ensino fundamental incompleto – EFC= ensino fundamental completo – EMI= ensino médio incompleto – EMC= ensino médio completo

Sobre a provável forma de infecção pelo *S. mansoni*, 100% dos pacientes portadores da doença relataram terem tido contato com água de rio infectado com molusco *Biomphalaria* e a maioria (90,54%) havia realizado tratamento para a doença. Destes, 81,08% (60/74) foram infectados em água de rios da Zona da Mata Pernambucana (ZM), 17,57% (13/74) informaram a forma de infecção através de água de rios pertencentes à região metropolitana do Recife (RMR) e apenas 1 (1,35%) foi infectado em água de rio de outros Estados (tabela 3).

O último contato com essas águas suspeitas de infecção também foi questionado e o resultado demonstrou que a maioria dos pacientes teve o último contato com águas infectadas

há mais de 10 anos (60,81%), 28,38% tiveram contato nos últimos 10 anos e que uma minoria (10,81%) ainda tem contato com essas águas (tabela 3).

**Tabela 3-** Região geográfica de infecção e último contato com águas infectadas dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013

<b>Característica epidemiológica</b>	<b>%</b>
<b>Região de contato</b>	
ZM	81,08
RMR	17,57
Outros estados	1,35
<b>Último contato com águas infectadas</b>	
Mantém contato	10,81
<10 anos	28,38
>10 anos	60,81

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco – ZM= Zona da Mata – RMR= Região metropolitana do Recife.

As medianas do número de plaquetas dos grupos A, C+D e E+F foram 202, 146 e 65 /mm<sup>3</sup>, respectivamente. Foram observados quadros de trombocitopenia em 47,8% dos pacientes do grupo C+D e em 93,3% do grupo E+F. Pacientes com fibrose grave apresentavam uma diminuição acentuada do número de plaquetas quando comparados com os pacientes com fibrose moderada ( $p = 0,0066$ ). Além disso, pacientes com fibrose grave apresentavam uma diminuição do número de plaquetas quando comparados com os pacientes sem fibrose ( $p < 0,0001$ ).

Os níveis séricos dos marcadores bioquímicos AST e ALT retirados dos prontuários foram comparados entre os grupos com diferentes graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica. O AST apresentou uma mediana de 28 U/L no grupo C+D e 30 U/L no grupo E+F não sendo observada diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,6811$ ). Quanto à ALT, foi observada uma mediana de 21,5 U/L no grupo C+D e 23 U/L no grupo E+F. Ao compararmos os níveis de ALT entre os grupos estudados, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo com fibrose moderada e fibrose grave ( $p = 0,0017$ ).

Com relação às enzimas colestáticas,  $\gamma$ -GT e FA, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ( $p = 0,7116$  para FA e  $p = 0,1499$  para  $\gamma$ -GT). As medianas nos grupos com fibrose moderada foram: FA = 99 U/L e  $\gamma$ -GT= 57,5 U/L. Já as medianas no grupo com fibrose avançada foram: FA= 84 e  $\gamma$ -GT= 85.

## 7.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura celular de sangue total em pacientes com diferentes graus de fibrose periportal esquistossomótica

### 7.2.1 Produção do receptor antagonista de IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2)

Após a etapa de padronização do DuoSet do IL-13R $\alpha$ 2, os parâmetros testados e selecionados para a realização dos experimentos foram descritos na quadro 1. Em seguida, foi realizada a coleta do sobrenadante celular após 48 horas (tempo de cultivo celular onde foi verificada a maior produção do receptor) do estímulo com SEA para posterior dosagem do receptor (através do Human DuoSET IL-13R $\alpha$ 2 R&D Systems).

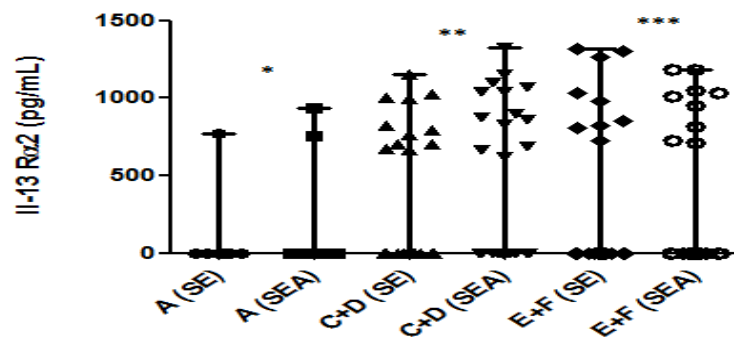
**Quadro 1-** Representação dos parâmetros selecionados na padronização do DuoSet ELISA IL-13R $\alpha$ 2

Tipo de substrato	Água para preparo dos reagentes	BSA	Temperatura das amostras	Tipo de placa
TMB (R&D Systems)	Ultra-pura	BSA (lote 017K0775 Sigma)	Temperatura ambiente	Immulon 4 (ThermoLabsystems)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após as dosagens, os níveis do IL-13R $\alpha$ 2 nos grupos com diferentes graus de fibrose hepática são mostrados na figura 8. Não foram identificados nos grupos com diferentes graus de fibrose, aumento do receptor após estímulo com SEA, em comparação com o controle interno (sem estímulo), onde encontramos  $p=0,5939$  no grupo A,  $p=0,4914$  no grupo C+D e  $p=0,7703$  no grupo E+F (figura 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados após estímulo com SEA ( $p=0,7413$ ).

**Figura 8-** Níveis do IL-13R $\alpha$ 2 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal



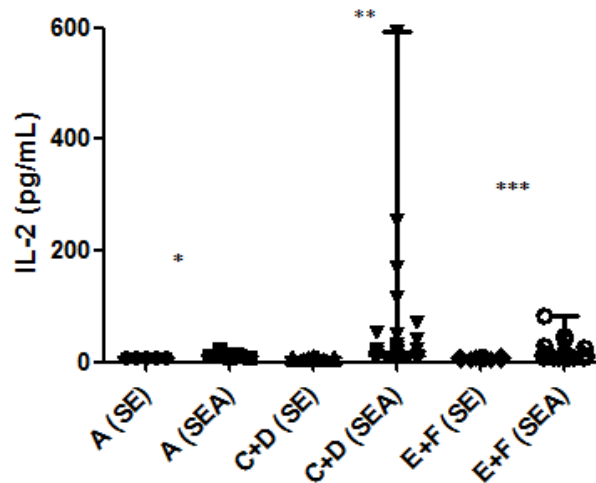
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p=0,5939$ ; \*\*:  $p=0,4914$ ; \*\*\*:  $p=0,7703$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

### 7.2.2 Citocinas do perfil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ )

Foram analisados os níveis de IL-2, nos pacientes com os diferentes graus de fibrose hepática, após 96 horas de estimulação com SEA. Foi observado um aumento nos níveis dessa citocina nos grupos A ( $p = 0,0317$ ), C+D ( $p < 0,0001$ ) e E+F ( $p < 0,0001$ ), em comparação com o controle interno negativo (sem estímulo) (figura 9). Não houve diferença estatisticamente significativa, após estímulo com o antígeno, entre os grupos sem fibrose e com fibrose moderada a grave ( $p = 0,8806$ ).

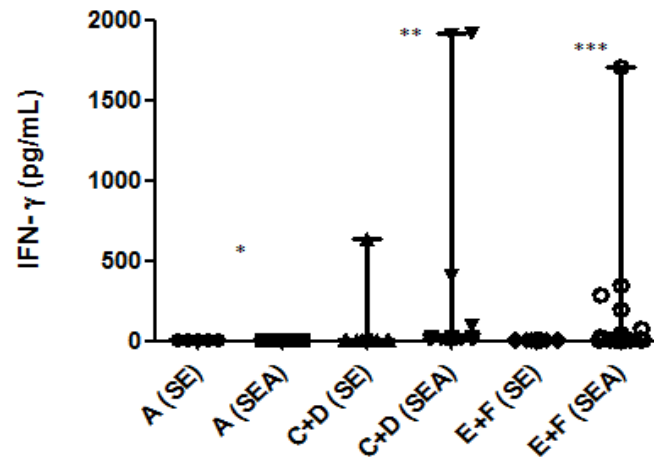
**Figura 9-** Níveis do IL-2 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,0317$ ; \*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

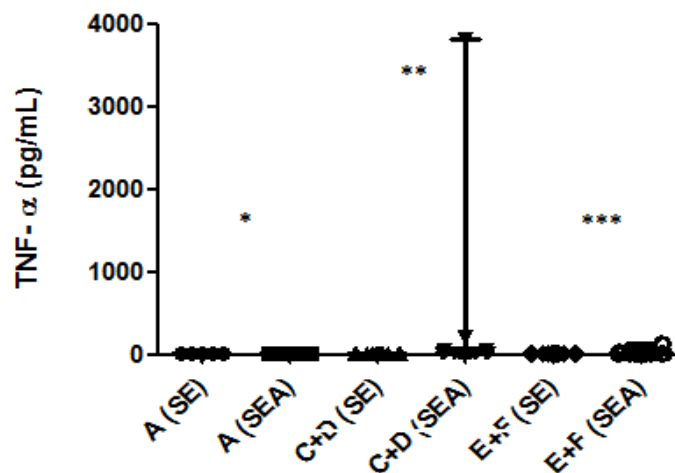
A figura 10 mostra os níveis de IFN- $\gamma$  no controle interno (sem estímulo) e após estímulo com SEA, nos três grupos avaliados. Foi observada produção aumentada dessa citocina após estimulação antigênica (quando comparado com o controle interno sem estímulo) nos grupos C+D ( $p < 0,0001$ ) e E+F (figura 10;  $p = 0,0008$ ). Porém, observamos que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sem fibrose e com fibrose moderada a grave, após estímulo com SEA ( $p = 0,5899$ ).

**Figura 10-** Níveis do IFN- $\gamma$  nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,0952$ ; \*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*:  $p = 0,0008$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

A produção de TNF- $\alpha$  induzida pelo SEA também foi avaliada nos indivíduos sem fibrose (A) e com fibrose moderada a grave (C+D e E+F). Observamos, na figura 11, um aumento nos níveis dessa citocina após estímulo com antígeno, nos grupos C+D ( $p = 0,0040$ ) e E+F ( $p = 0,0044$ ), quando comparado com o controle interno (sem estímulo). Porém, não identificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, após estimulação antigênica ( $p = 0,9612$ ).

**Figura 11-** Níveis do TNF- $\alpha$  nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal

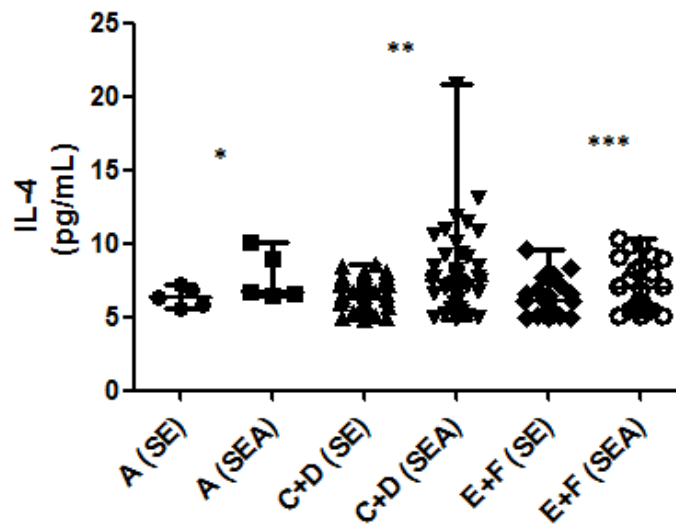
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,0952$ ; \*\*:  $p = 0,0040$ ; \*\*\*:  $p = 0,0044$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

### 7.2.3 Citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13)

Com relação aos níveis de IL-4 produzidos após estímulos com SEA foi observado um aumento dessa citocina após esse estímulo, em comparação com o controle interno (sem estímulo) no grupo C+D ( $p= 0.0059$ ), como mostra a figura 12. Após estímulo com SEA, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ( $p = 0, 4743$ ).

**Figura 12-** Níveis do IL-4 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal

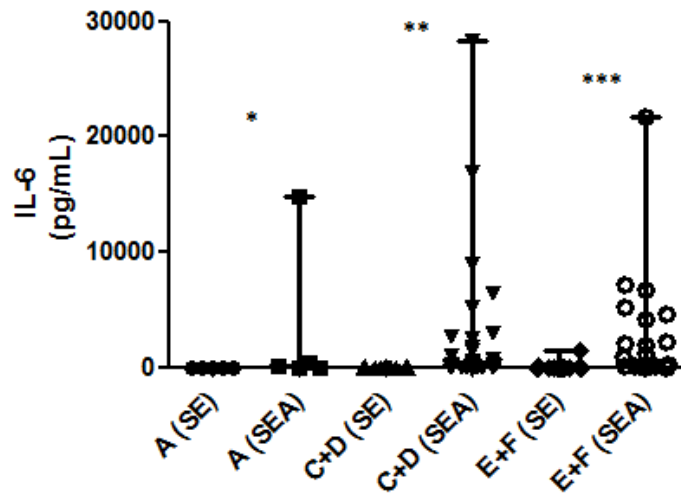


Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0, 2222$ ; \*\*:  $p = 0,0059$ ; \*\*\*:  $p = 0,1010$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

Os níveis de IL-6 produzidos após estímulo com SEA, em comparação com o controle interno (sem estímulo), foram representados na figura 13 e estavam aumentados nos grupos A ( $p = 0,0362$ ), C+D ( $p < 0,0001$ ) e E+F ( $p < 0,0001$ ). Porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos estudados após estímulo com antígeno ( $p = 0, 2756$ ).

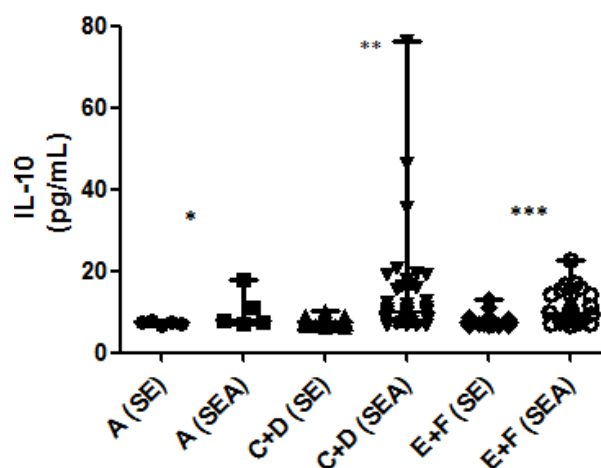


**Figura 13-** Níveis do IL-6 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,0362$ ; \*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

Com relação a produção de IL-10 nas culturas estimuladas com SEA em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, podemos observar na figura 14 um aumento na expressão dessa citocina nos grupos C+D ( $p < 0,0001$ ) e E+F ( $p = 0,0009$ ), quando comparados com o controle interno (sem estímulo). Após estímulo com SEA, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos estudados ( $p = 0,6722$ ).

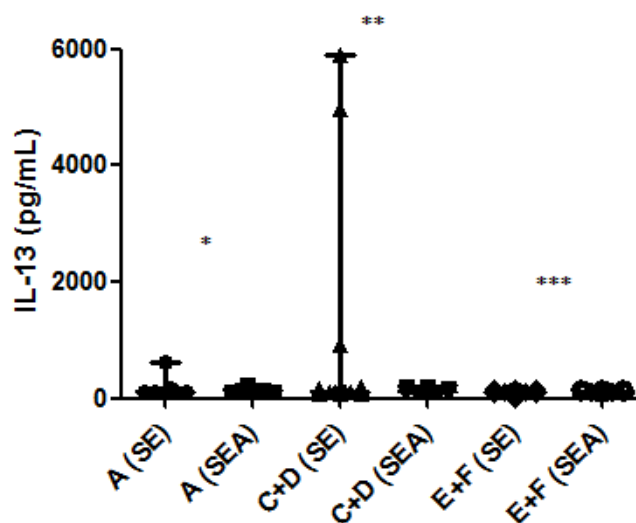
**Figura 14-** Níveis do IL-10 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,1412$ ; \*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*:  $p = 0,0009$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo

Os níveis de IL-13, nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal são mostrados na figura 15. Não foram identificados aumentos dessa citocina quando comparamos o controle interno (sem estímulo) e o estímulo com SEA (figura 15), nos grupos sem fibrose (A), fibrose moderada (C+D) e grave (E+F). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados após estimulação antigênica ( $p = 0,9807$ ).

**Figura 15-** Níveis da IL-13 nos grupos com diferentes graus de fibrose periportal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A figura representa as medianas dos grupos estudados, com valores de mínimo e máximo; \*:  $p = 0,8477$ ; \*\*:  $p = 0,9242$ ; \*\*\*:  $p = 0,2964$  quando comparado o grupo estimulado com o correspondente sem estímulo; A= grupo com padrão de fibrose A; CD= grupo com padrão de fibrose C+D; EF= grupo com padrão de fibrose E+F; SE= sem estímulo; SEA= antígeno solúvel do ovo.

### 7.3 Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de pacientes portadores da esquistossomose mansônica

#### 7.3.1 Correlações observadas em pacientes do grupo controle (padrão de fibrose A)

A tabela 4 expressa às correlações entre as citocinas produzidas obtidas a partir do estímulo com SEA de *S. mansoni*. Os resultados apontam correlações negativas significativas de -0,40 e -0,80 entre IL-13 e IFN- $\gamma$  e entre IL-13 e IL-13R $\alpha$ 2, respectivamente.

#### 7.3.2 Correlações observadas em pacientes do grupo caso (padrão de fibrose C+D e E+F)

Na análise de correlação para os pacientes do grupo C+D, não identificamos correlação estatisticamente significativa entre a IL-13 e IL-13R $\alpha$ 2 (-0,29;  $p = 0,0582$ ).

Observamos correlação positiva entre as citocinas: IFN- $\gamma$  e IL-6 (0,42), IFN- $\gamma$  e IL-10 (0,41), TNF- $\alpha$  e IL-6 (0,47) e IL-2 e IL-10 (0,32); e entre as citocinas: IL-2 e IL-4 (0,66), TNF- $\alpha$  e IL-4 (0,57), após estímulo com SEA. Observamos também uma correlação positiva significativa entre citocinas Th1, onde foram encontradas correlações de 0,46 entre IFN- $\gamma$  e IL-2 e 0,44 entre TNF- $\alpha$  e IL-2, e entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (0,56). Os resultados demonstram também uma correlação entre as citocinas do perfil Th2, onde foram identificadas correlações positivas entre as citocinas IL-4 e IL-10 (0,52) e IL-6 e IL-10 (0,53) (Tabela 4).

Observamos na tabela 4 correlações positivas significativas de 0,43 entre as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6, de 0,41 entre TNF- $\alpha$  e IL-6 e 0,46 entre IL-13 e IFN- $\gamma$  nos pacientes do grupo com padrão de fibrose E+F. Identificamos também uma correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (0,71) e entre IL-6 e IL-10 (0,58) e uma correlação entre as citocinas IL-4 e IL-10 (0,41). Não identificamos correlação estatisticamente significativa entre a IL-13 e IL-13R $\alpha$ 2 (-0,13;  $p = 0,5238$ ) nos pacientes com padrão de fibrose E+F.

**Tabela 4-** Correlações das citocinas nos grupos com diferentes padrões de fibrose periportal dos pacientes com Esquistossomose do HC/UFPE, 2013

Correlação	A ( $\rho$ )	p	C+D ( $\rho$ )	p	E+F ( $\rho$ )	p
IFN- $\gamma$ x TNF- $\alpha$	0,63	0,2333	0,56*	<0,0001	0,71*	<0,0001
IFN- $\gamma$ x IL-2	0,47	0,4667	0,46*	0,0015	0,35	0,0888
TNF- $\alpha$ x IL-2	0,6	0,3500	0,44*	0,0027	0,38	0,0632
IL-4 x IL-6	0,7	0,2333	0,09	0,5435	-0,057	0,7883
IL-4 x IL-10	0,9	0,0833	0,52*	0,0003	0,41*	0,0433
IL-6 x IL-10	0,6	0,35	0,53*	0,0002	0,58*	0,0029
IFN- $\gamma$ x IL-4	0,94	0,0667	0,26	0,0825	0,02	0,8973
IFN- $\gamma$ x IL-6	0,63	0,3333	0,42*	0,0047	0,43*	0,0320
IFN- $\gamma$ x IL-10	0,94	0,0667	0,41*	0,0053	0,09	0,6666
TNF- $\alpha$ x IL-4	0,6	0,3500	0,57*	<0,0001	0,14	0,4987
TNF- $\alpha$ x IL-6	0,9	0,0833	0,47*	0,0014	0,41*	0,0438
TNF- $\alpha$ x IL-10	0,7	0,2333	0,61*	<0,0001	0,18	0,3970
IL-2 x IL-4	0,2	0,7833	0,66*	<0,0001	0,36	0,0838
IL-2 x IL-6	0,3	0,6833	0,14	0,3560	0,3	0,1456
IL-2 x IL-10	0,5	0,4500	0,32*	0,0351	0,28	0,1796
IL-13 x IFN- $\gamma$	-0,4*	<0,0001	0,28	0,0616	0,46*	0,0211
IL-13 x IL-13R $\alpha$ 2	-0,8*	<0,0001	-0,29	0,0582	-0,13	0,5238

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco;  $\rho$  = valores de rho da correlação de spearman; \* = correlação significativa existente entre as citocinas; A= padrão de fibrose A; C+D= padrão de fibrose CD; E+F= padrão de fibrose EF

#### 7.4 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura celular de sangue total em pacientes com diferentes formas clínicas da esquistossomose

A tabela 5 representa os níveis do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2, dosados nos sobrenadantes de cultura, após estímulo com SEA, e comparados com os sem estímulo (controle interno), de pacientes infectados com esquistossomose mansônica portadores das formas EHI, EH e EHE. Não observamos aumento de IL-13R $\alpha$ 2 e IL-13 na forma EHI quando comparados o sem estímulo (controle interno) com o estímulo com SEA. Observamos na forma EHI, quando comparamos com o controle interno (sem estímulo), aumento das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 (tabela 5). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis do receptor e das citocinas quando comparamos entre as três formas clínicas entre si (tabela 6).

Na forma EHE identificamos, após estímulo com SEA, aumento das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 IL-6 e L-10, quando comparados com o sem estímulo (controle interno). Não observamos aumento nos níveis do receptor e da IL-13 após estímulo com SEA (quando comparados com o sem estímulo) na forma EHE (tabela 5).

Também não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis do receptor e das citocinas quando comparamos entre as três formas clínicas entre si (tabela 6). No nosso estudo, não identificamos aumento nos níveis das citocinas avaliadas na forma EH. O n muito pequeno desse grupo (por ser uma nova forma de classificação), pode justificar a ausência das citocinas estudadas.

**Tabela 5-** Níveis do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 nos sobrenadantes de cultura celular após estímulo com antígeno solúvel de ovo (SEA) e sem estímulo (meio de cultura) de pacientes com diferentes formas clínicas da doença selecionados no HC/UFPE, 2013

Citocina	EHI (SExSEA)	EH (SExSEA)	EHE (SExSEA)
IFN- $\gamma$	p = 0,0006*	p = 0,6004	p < 0,0001*
TNF- $\alpha$	p = 0,6057	p = 0,4206	p = 0,0002*
IL-2	p < 0,0001*	p = 0,2222	p < 0,0001*
IL-4	p = 0,0028*	p = 1,0000	p = 0,0208*
IL-6	p < 0,0001*	p = 0,0952	p < 0,0001*
IL-10	p < 0,0001*	p = 0,1508	p < 0,0001*
IL-13	p = 0,7886	p = 0,9365	p = 0,2450
IL-13R $\alpha$ 2	p = 0,6623	p = 0,4211	p = 0,6937

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco; EHI= esquistossomose hepatointestinal; EH= esquistossomose hepática; EHE=esquistossomose hepatoesplênico; SE= sem estímulo; \*= p estatisticamente significativo (p<0, 05)

**Tabela 6-** Comparação entre os níveis do IL-13R $\alpha$ 2 e das citocinas Th1 e Th2 entre as diferentes formas clínicas da doença nos pacientes do HC/UFPE, 2013

<b>Citocina</b>	<b>EHIxEHxEHE</b>
IFN- $\gamma$	p = 0, 6450
TNF- $\alpha$	p = 0, 6512
IL-2	p = 0, 4505
IL-4	p = 0, 1925
IL-6	p = 0, 6467
IL-10	p = 0, 1927
IL-13	p = 0, 3648
IL-13R $\alpha$ 2	p = 0, 1545

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco; EHI= esquistossomose hepatointestinal; EH= esquistossomose hepática; EHE=esquistossomose hepatoesplênico

### 7.5 Correlações entre a produção das citocinas nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica

Na análise de correlação entre as citocinas nos pacientes com a forma EHI, não identificamos correlação estatisticamente significativa entre a IL-13 e IL-13R $\alpha$ 2 (-0,21; p = 0,2904). Observamos correlação positiva entre as citocinas: IFN- $\gamma$  e IL-2 (0,41), IFN- $\gamma$  e IL-4 (0,46), TNF- $\alpha$  e IL-2 (0,38) e IL-4 e IL-6 (0,44); e entre as citocinas: IFN- $\gamma$  e IL-6 (0,52), IFN- $\gamma$  e IL-10 (0,71), TNF- $\alpha$  e IL-4 (0,70), TNF- $\alpha$  e IL-6 (0,56) e TNF- $\alpha$  e IL-10 (0,56), após estímulo com SEA. Observamos também uma correlação positiva significativa entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (0,70), IL-4 e IL-10 (0,50), IL-6 e IL-10 (0,70) e entre IL-2 e IL-4 (0,60) após estimulação antigênica (Tabela 7).

Nos pacientes com a forma clínica EHE (tabela 7) observamos correlação entre IL-13R $\alpha$ 2 e IL-13 (0,37), entre IFN- $\gamma$  e IL-13 (0,43), IFN- $\gamma$  e IL-2 (0,44), IFN- $\gamma$  e IL-6 (0,37), TNF- $\alpha$  e IL-4 (0,36), TNF- $\alpha$  e IL-6 (0,42), TNF- $\alpha$  e IL-10 (0,48), IL-2 e IL-4 (0,43) e IL-2 e IL-10 (0,35). Identificamos correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (0,67), IL-4 e IL-10 (0, 53) e IL-6 e IL-10 (0, 50). No nosso estudo não identificamos correlação entre o receptor e as citocinas na forma EH (dados não mostrados).

**Tabela 7-** Correlações das citocinas nos pacientes com as diferentes formas clínicas da Esquistossomose do HC/UFPE, 2013

<b>Correlação</b>	<b>EHI (<math>\rho</math>)</b>	<b>P</b>	<b>EHE (<math>\rho</math>)</b>	<b>p</b>
IFN- $\gamma$ x TNF- $\alpha$	0,70*	0,0001	0,67*	<0,0001
IFN- $\gamma$ x IL-2	0,41*	0,0429	0,44*	0,0031
TNF- $\alpha$ x IL-2	0,38*	0,0102	0,40	0,0524
IL-4 x IL-6	0,44*	0,0282	0,14	0,356
IL-4 x IL-10	0,50*	0,0114	0,53*	0,0002
IL-6 x IL-10	0,70*	0,0001	0,50*	0,0006
IFN- $\gamma$ x IL-4	0,46*	0,0224	0,39	0,1334
IFN- $\gamma$ x IL-6	0,52*	0,0078	0,37*	0,0122
IFN- $\gamma$ x IL-10	0,71*	<0,0001	0,20	0,1771
TNF- $\alpha$ x IL-4	0,70*	0,0001	0,36*	0,0147
TNF- $\alpha$ x IL-6	0,56*	0,0041	0,42*	0,0045
TNF- $\alpha$ x IL-10	0,57*	0,0033	0,48*	0,0011
IL-2 x IL-4	0,60*	0,0018	0,43*	0,0035
IL-2 x IL-6	0,22	0,2956	0,19	0,2093
IL-2 x IL-10	0,23	0,2637	0,35*	0,0184
IL-13 x IFN- $\gamma$	0,03	0,8480	0,43*	0,0036
IL-13 x IL-13R $\alpha$ 2	-0,21	0,2904	-0,37*	0,0123

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: HC/UFPE= Hospital das clínicas de Pernambuco;  $\rho$  = valores de rho da correlação de spearman ;\* = correlação significativa existente entre as citocinas

---

---

## 8 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos em populações de áreas endêmicas indicam que o processo de fibrose hepática que ocorre durante a esquistossomose pode estar relacionado com diversos fatores da população (sexo, idade, carga parasitária, fatores imunológicos e genéticos) (ANDRADE, 2009). O entendimento dos mecanismos pelo qual a fibrogênese se desenvolve nessas populações, que estão submetidas às mesmas condições ambientais daqueles indivíduos que não a desenvolvem, ainda não está completamente elucidado e é alvo de diversos estudos na atualidade (ANDRADE, 2009).

A análise da idade dos pacientes do presente estudo, com variação entre 18 a 65 anos, revelou uma mediana de 53, 5 anos. Esse resultado condiz com o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2006), onde os pacientes incluídos no estudo apresentavam mediana de 53 anos de idade. Isso pode ser explicado pela resposta imune induzida pela reexposição constante ao parasita ao longo da vida ou pelo lento processo de formação da fibrose. Os indivíduos mais jovens, portanto, não foram expostos tempo suficiente para efeitos cumulativos de deposição do colágeno no trato periportal (SOUZA *et al.*, 2012).

Dos pacientes portadores da esquistossomose, no nosso estudo, mais de 60% eram do sexo feminino. Em outros estudos realizados por Gazzinelli *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2010) também foram encontrados uma proporção maior do sexo feminino, sendo o primeiro trabalho encontrado 52,8% dos pacientes desse sexo. Além disso, Gazzinelli *et al.* (2006) afirmam que essa proporção maior em mulheres pode ser justificada devido ao contínuo uso das águas dos rios para realizar atividades domésticas, como lavar roupas, louças e tomar banho. Essas condições são consideradas como possíveis fatores responsáveis pela contaminação ligada ao sexo, indicando que essa susceptibilidade feminina tem explicações socioeconômicas.

Analisando o grau de escolaridade, o resultado encontrado foi de um grande percentual de pacientes apenas com ensino fundamental incompleto (63,51%). Este resultado está de acordo com os achados de Pereira *et al.* (2010), onde a prevalência da doença foi maior entre pessoas mais pobres, vivendo no interior dos Estados e com baixo nível de escolaridade. A orientação adequada à população é indispensável para a prevenção, assim, melhorias na educação podem levar os pacientes a procurarem tratamento precoce, evitando os casos de reinfecções pelo parasita (SILVA; LEAL; DOMINGUES, 2013). Apesar disso, Silva, Leal e Domingues (2013), identificaram uma pequena melhora no nível de educação

---

---

---

---

entre os pacientes, possivelmente devido ao crescimento socioeconômico do país nos últimos anos.

De acordo com a renda familiar baseado em salários mínimos, nesse estudo evidenciou-se que 67,57% dos pacientes eram provenientes de segmentos menos favorecidos e com baixos salários (1 a 2 salários mínimos). Esse resultado indica que a melhoria nas condições econômicas e de educação, aliadas a medidas de saneamento básico poderiam contribuir para minimizar este importante problema de saúde pública (SILVA; LEAL; DOMINGUES, 2013).

Embora a água potável seja um fator para redução da exposição em áreas endêmicas de esquistossomose (apenas 7 indivíduos do estudo não tinham saneamento básico na residência), a predominância de trabalho agrícola facilita o contínuo uso de fontes de águas infectadas de caramujos, pela população. A maioria das famílias, como é mostrado no trabalho de Gazzinelli *et al.* (2006), continua a usar água de rios para lavar roupas, tomar banho, pescar e desenvolver atividades recreativas (principalmente mulheres). Existe, porém, uma alta vulnerabilidade à infecção mesmo dentre aqueles que não exerciam atividades intrínsecas ao rio, devido a falta de saneamento básico e pelo uso de rios para outras diversas atividades. Outras razões para o uso elevado de águas infectadas é a maior quantidade em volume de água encontrada em córregos e rios e a existência de avarias nos sistemas rudimentares de distribuição de água dessas populações (GAZZINELLI *et al.*, 2006).

O local de infecção da doença também foi dimensionado e no nosso estudo encontramos os pacientes indicando ter tido contato com água de rios infectados pelo *S. mansoni*, principalmente na Zona da Mata do Estado (81,08%). Nesse sentido, corroborando com nosso estudo, Silva, Leal e Domingues (2013), encontraram uma predominância da doença ainda situada na Zona da Mata pernambucana, apesar da expansão para áreas na região metropolitana e litoral. Também Brandt *et al.* (2010), encontraram uma maior prevalência da doença na Zona da Mata do estado de Pernambuco. Além disso, é importante salientar que o aumento da população em áreas endêmicas, eleva o número de pessoas com risco de contaminação pela esquistossomose (CHITSULO *et al.*, 2000).

No nosso estudo, encontramos 60,8% dos indivíduos com mais de dez anos sem contato com águas de rios. A forma EHE necessita de 5 a 15 anos para se estabelecer como doença no indivíduo (SILVA; LEAL; DOMINGUES, 2013) e isso pode explicar o tempo entre último contato com água de rios infectados pelo *S. mansoni* e a tardia e já crônica identificação da doença. Além disso, a falta de sintomatologia ou a semelhança de sintomatologia inicial com outras doenças pode levar o indivíduo a não procurar atendimento

---

---



---

---

por muitos anos, justificando o elevado tempo entre o último contato com rio e o descobrimento de formas graves da doença (SILVA; LEAL; DOMINGUES, 2013).

Assim, melhorias na qualidade de vida da população, incluindo melhores condições de saneamento básico e educação, aliados a avaliação e monitoramento médico, principalmente relacionado às varizes esofágicas e melhores condições hospitalares para atendimento de pacientes com esquistossomose e melhoria no diagnóstico, são necessários para um aumento da qualidade de vida desses pacientes e diminuição da morbidade e mortalidade pela doença parasitária (SILVA; LEAL; DOMINGUES, 2013).

Nos últimos anos, a mensuração do número de plaquetas no sangue tem sido utilizada como um excelente marcador indicativo de gravidade da doença. A redução dessa contagem de plaquetas está relacionada com o aumento de sangramento, além de presença de fibrose periportal e hipertensão portal (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007). No nosso estudo, observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sem fibrose e fibrose grave, e entre os grupos com fibrose moderada e grave. O baixo custo, a facilidade de acesso ao exame de contagem de plaquetas, aliados com esses resultados, indicam que esse exame representa um adequado marcador biológico, identificando pacientes com e sem fibrose (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007).

O processo de fibrose hepática desenvolve-se em uma variedade de doenças humanas, como hepatite B, hepatite C, dentre outras. A ativação das células estreladas hepáticas é o evento dominante na fibrogênese e consiste na alteração fenotípica dessas células em fibroblastos e em miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos (ANTHONY *et al.*, 2010; FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009). Com o desenvolvimento do processo fibrótico, ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM hepática (WYNN, 2004, 2007), devido ao acúmulo em excesso de proteínas, componentes da matriz extracelular que são produzidas pelos miofibroblastos (BRANDT *et al.*, 2010).

As principais citocinas reguladoras associadas com a produção de ECMP são: TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-13, IL-5, IL-10. Estudos em camundongos e humanos com esquistossomose identificaram o papel anti-fibrótico do IFN- $\gamma$ , através da sua atuação na inibição da produção de ECMP pelas células estreladas. A partir dessa inibição, ocorreria a síntese de MPs, aumentando assim, a atividade das colagenases do fígado, além da inibição da síntese dos TIMPs (DESSEIN *et al.*, 1999; HENRI *et al.*, 2002). Em modelo murino da esquistossomose, as citocinas TGF- $\beta$ , IL-13 e IL-4 são relacionadas com a fibrogênese e estimulam as células estreladas hepáticas a se transformarem em miofibroblastos e exercem o efeito oposto ao IFN- $\gamma$  na síntese das ECMP e TIMPs, sendo a IL-13 a principal citocina

---

---

---

---

fibrótica envolvida no processo (CHIARAMONTE *et al.*, 2001). Os mecanismos de controle da atividade da IL-13 estão ligados aos receptores desta citocina que são formados por duas cadeias de ligação, o IL-13R $\alpha$ 1 e o IL-13R $\alpha$ 2 (FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

Estudos tem relacionado o IL-13R $\alpha$ 2 como um importante regulador da resposta imune em diversas doenças, como asma, alergias e inflamações pulmonares (MENTINK-KANE *et al.*, 2004). Para estudar o papel da IL-13 foi utilizado em camundongos, no estudo de Wilson *et al.* (2007) o sIL-13R $\alpha$ 2, para bloquear as atividades da citocina. Tratamento em camundongos com sIL-13R $\alpha$ 2 reduziu o volume do granuloma em mais de 50%. Isso revela claramente o papel de IL-13 na indução da resposta inflamatória frente à infecção (CHIARAMONTE *et al.*, 1999). A regulação do receptor é crítica para o controle de IL-13 na patologia hepática. Camundongos com ausência do receptor desenvolvem fibrose exacerbada (WILSON *et al.*, 2007).

O estudo de Mentink-Kane *et al.* (2004) demonstrou um aumento de IL-13R $\alpha$ 2 no soro de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, apesar de não relatar diferenças na expressão do receptor com o aumento da intensidade de infecção. O nível global do receptor nos indivíduos fracamente infectados também foi bastante semelhante aos daqueles cronicamente infectados. Em contraste com o receptor, os níveis de IL-13 foram muito instáveis nos pacientes e não houve correlação com os do receptor em pacientes com grau de fibrose elevado, assim como no nosso estudo (MENTINK-KANE *et al.*, 2004). Nós não identificamos diferença entre os níveis do receptor nos indivíduos cronicamente infectados com os graus de fibrose periportal e com diferentes formas clínicas da doença.

No nosso trabalho, também foram identificados baixos níveis tanto do receptor como da IL-13 e encontramos correlação negativa significativa entre ambos, em indivíduos com padrão de fibrose A, sugerindo um aumento da IL-13, no início do processo de fibrogênese, saturando o receptor e tornando a citocina livre e disponibilizada no meio. Identificamos também correlação negativa entre a IL-13 e o receptor na forma EHE. No estudo de Chiaramonte *et al.* (2003), os níveis do receptor foram marcadamente reduzidos em camundongos com ausência de IL-13, o que poderia justificar esse nível reduzido do receptor nos grupos estudados. O bloqueio dos receptores dessa citocina e da IL-4 impede o desenvolvimento de granuloma e fibrose hepática em camundongos (SOUZA *et al.*, 2012).

Wilson *et al.* (2007) identificaram papéis distintos, mas cooperativos entre IL-10 e IL-13R $\alpha$ 2, no processo de fibrose periportal. Mentink-Kane *et al.* (2011) através de estudos preliminares realizados com camundongos infectados e deficientes de IL-10, IL-13R $\alpha$ 2 e IL-

---

---

---

---

12p40 sugeriram que, quando um único gene regulador for suprimido, outro mecanismo supressor estaria aumentado, compensando a falta da via suprimida. Camundongos deficientes de IL-13Ra2 apresentaram um aumento acentuado na produção de IL-10. Na ausência de IL-10, IL-12p40 e IL-13Ra2, ocorre um desenvolvimento da fibrose periportal, o que contribui para o aparecimento de anemia, trombocitopenia, hemorragia gastrointestinal, ascite e mortalidade de pacientes (MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

Chiaromonte *et al.* (2003) e Zheng *et al.* (2003) também revelaram que a indução de expressão do receptor por IFN- $\gamma$  pode representar um novo mecanismo de regulação de IL-13. Assim como no estudo de Chiaromonte *et al.* (2003), nosso trabalho também não conseguiu suportar essa hipótese, o que pode ser justificado pelo diferente modelo estudado (CHIARAMONTE *et al.*, 2003).

Alguns estudos demonstraram papel importante de citocinas Th1 na redução desse processo de fibrose. A avaliação da produção da citocina IL-2 no nosso estudo, em sobrenadante de cultura celular de sangue total, demonstrou níveis elevados desta citocina após estímulo com SEA nos grupos estudados, apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles. Este resultado foi semelhante ao observado por Oliveira-Prado *et al.* (2012), que identificaram um aumento de IL-2, após estimulação com SEA, nos pacientes cronicamente infectados (com diferentes graus de fibrose). O mesmo estudo identificou aumento de IL-4, IL-5 e TNF- $\alpha$ , sugerindo uma resposta mista Th1/Th2 em grupos infectados, após estímulo com antígenos de *S. mansoni*. No nosso estudo, nós identificamos correlações positivas entre IL-2 e IL-10, entre IFN- $\gamma$  e IL-2 e entre TNF- $\alpha$  e IL-2, nos grupos com fibrose moderada a grave e nas formas EHI e EHE, que sugerem essa resposta mista nos pacientes com graus de fibrose moderada a grave e com as diferentes formas clínicas da doença.

Ridi *et al.* (2006), após imunização de camundongos das linhagens CD1, BALB/c e C57BL/6 com diversas proteínas (como Sm14, isomerase de triose-fosfato e glutathione-S-transferase), relataram uma indução de produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e anticorpos específicos, mas que não conferiram uma proteção consistente contra a infecção pelo parasita. Pearce *et al.* (2012) estudando pacientes, utilizando sangue estimulados com antígenos do ovo, identificaram uma modulação na produção de IL-4 através das citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ), corroborando com a correlação positiva encontrada no nosso estudo entre IL-2 e IL-4 nos pacientes com padrão de fibrose C+D e com a forma clínica EHE. Mwatha *et al.* (1998) também identificaram um aumento da resposta Th1 após estimulação com SEA em pacientes com a forma mais grave da doença, corroborando com o aumento das citocinas Th1 nos

---

---

---

---

pacientes com padrão de fibrose C+D e nos pacientes com a forma EHE da doença encontrado no nosso estudo. Pearce *et al.* (2012) identificaram que após a oviposição (EHI), ocorre um aumento de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) em camundongos e esse aumento de IL-2 nos pacientes com a forma EHI foi identificado no nosso estudo.

Mentink-kane *et al.* (2011) e Wynn (2000) têm sugerido o papel antifibrótico do IFN- $\gamma$ , uma vez que ele atua inibindo a produção de ECMP, aumentando a atividade de colagenases no fígado. Souza *et al.* (2012) encontraram níveis elevados dessa citocina em pacientes com fibrose moderada e grave, não encontrando diferenças entre os grupos estudados. Esse resultado está de acordo com nossos achados, onde foi observado um aumento de IFN- $\gamma$ , após estímulo com SEA, nos grupos com padrão de fibrose C+D e E+F, sem diferenças entre os grupos. Este dado pode sugerir uma tentativa de controle da progressão do processo fibrogênico em pacientes cronicamente infectados. Altos níveis de IFN- $\gamma$  têm sido associados com proteção para indivíduos infectados por esquistossomose em áreas endêmicas. Isso pode explicar o aumento dessa citocina nos grupos estudados (OLIVEIRA-PRADO *et al.*, 2012). Aumento de IL-13, IFN- $\gamma$  e IL-10 são observados em pacientes cronicamente infectados, identificando uma ausência de supressão imunológica (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Apesar do nosso estudo não ter identificado aumento de IL-13, nós também observamos essa resposta mista Th1/Th2 nos pacientes estudados.

Analisando as citocinas nas diferentes formas clínicas da doença, nós identificamos aumento de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma EHI e EHE da esquistossomose. Estudos de Pearce *et al.* (2012) utilizando camundongos com EHI identificaram aumento de IFN- $\gamma$ . Mwatha *et al.* (1998) estudando indivíduos com a forma mais grave da doença, identificou após estímulo com SEA, aumento dessa citocina, corroborando com nossos achados.

Ademais, IL-4 e IL-13 podem estar atuando juntas, em altos níveis, na supressão de citocinas Th1. O estudo de Chiaramonte *et al.* (1999) demonstrou níveis elevados de IFN- $\gamma$  quando da ausência de uma dessas citocinas e níveis ainda mais elevados quando da ausência de ambas as citocinas. Foram encontrados no nosso trabalho, níveis baixos de IL-13 e altos de IFN- $\gamma$ , demonstrando a inexistência de uma supressão imunológica e um balanço Th1/Th2. Além disso, a neutralização de produção de IFN- $\gamma$  tem sido relacionada com a formação do granuloma e aumento de fibrose e um aumento nos níveis dessa citocina, estaria relacionado com uma tentativa de evitar a progressão da doença (MORAIS *et al.*, 2008; MWATHA *et al.*, 1998).

Embora com papel controverso, a citocina TNF- $\alpha$ , também pode participar na formação de granuloma e evolução da fibrose hepática (SOUZA *et al.*, 2012). Alguns autores

---

---

---

---

têm identificado o papel dessa citocina na progressão da fibrose periportal esquistossomótica, enquanto outros, como Hoffman *et al.* (1998) afirmaram que o TNF- $\alpha$  tem um efeito protetor no processo fibrogênico. No nosso estudo, foi identificado um aumento de TNF- $\alpha$  após estimulação com SEA nos grupos com fibrose moderada e grave, o que sugere que essa citocina pode estar envolvida no desenvolvimento da patologia associada à doença. Nossos resultados estão de acordo com o estudo realizado por Souza *et al.* (2012), onde também foram encontrados altos níveis de TNF- $\alpha$  após estimulação antigênica nos pacientes com padrão de fibrose C+D, porém sem diferenças entre os grupos estudados o que sugere a participação dessa citocina na patologia hepática em indivíduos cronicamente infectados. Henri *et al.* (2002), também indicaram um papel pró-fibrótico para essa citocina. o que sugere a participação dessa citocina na patologia hepática em indivíduos cronicamente infectados. Nosso resultado não corrobora com os dados encontrados por Silva-Teixeira (2004), que identificaram diferenças entre os grupos estudados (níveis mais elevados dessa citocina em pacientes com fibrose moderada a grave, do que naqueles sem fibrose).

O TNF- $\alpha$  apesar de ser produzido por uma diversidade celular é produzido principalmente por macrófagos. Células Th1 também podem produzir essa citocina de forma direta ou através da produção de IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, estudos tem relatado a participação de citocinas Th2 na limitação de produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Nesse contexto, a IL-4 tem sido vista como uma citocina inibidora da produção de TNF- $\alpha$  possivelmente através da regulação da expressão do gene dessa citocina (MWATHA *et al.*, 1998). No nosso estudo, foi identificada uma elevada produção de IL-4 e TNF- $\alpha$  e uma correlação entre dessas citocinas nos pacientes com a forma EHE e moderada nos pacientes com grau de fibrose C+D e na forma clínica EHI. Também observamos uma diminuição de IL-4 nos pacientes E+F, após estímulo com SEA.

Estudo realizado por Abath *et al.* (2006), também encontraram um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstrando o efeito protetor do IFN- $\gamma$ . O aumento de TNF- $\alpha$  estaria positivamente associado ao desenvolvimento de fibrose periportal, agravando a doença e, possivelmente, equilibrando o efeito protetor do IFN- $\gamma$ . Isso corrobora com a correlação significativa encontrada entre essas citocinas em pacientes com fibrose moderada e grave e nas formas EHI e EHE encontrada no nosso estudo. Além disso, o TNF- $\alpha$  é um forte indutor de IL-6, demonstrando seu papel na progressão da doença (KHALIL *et al.*, 1996). E isso corrobora com a correlação encontrada entre essas duas citocinas no nosso estudo. O perfil de produção de citocinas em pacientes com esquistossomose é bastante variável: alguns estudos mostram uma associação com perfil Th1 e outros com perfil Th2 (ABATH *et al.*, 2006).

---

---

---

---

Burke *et al.* (2009) identificou predominância de perfil Th2, associada com aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Pacientes com a forma EHE continuam a produzir alta resposta Th1, pois eles falham na inibição através das citocinas Th2, importantes no processo de desenvolvimento da doença (ABATH *et al.*, 2006).

Com relação à dosagem dos níveis de IL-4 no sobrenadante de cultura celular no nosso trabalho, foi identificado um aumento dessa citocina após estímulo com SEA no grupo com padrão de fibrose C+D e nos pacientes com as formas EHI e EHE da doença. Esse resultado está de acordo com o estudo de Oliveira-Prado *et al.* (2012), que encontraram altos níveis de IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , sugerindo uma resposta mista Th1/Th2, em grupos infectados após estímulo com antígenos de *S. mansoni*. Pearce *et al.* (2012), através de um estudo com camundongos, observaram produção de IL-4 maior em camundongos com infecções avançadas do que naqueles com infecções atenuadas. Silva-Teixeira *et al.* (2004) também identificaram aumento de IL-4 em indivíduos com grau de fibrose elevado, constatando o papel dessa citocina no processo fibrogênico. Abath *et al.* (2006) estudando pacientes com as formas EHI e EHE da doença, identificou uma predominância da resposta Th2, com aumento de IL-4 em ambas as formas, apesar dos pacientes continuarem a produzir alta resposta Th1, corroborando com nossos achados.

Outra citocina estudada, a IL-6, demonstra papel controverso na progressão da doença. Essa citocina, de acordo com estudo de Fielding *et al.* (2014), atua através dos fatores de transcrição (STAT1 e STAT3), desempenhando um papel de estimulação da infiltração leucocitária durante a infecção. No nosso estudo, nós identificamos aumento dessa citocina nos pacientes sem fibrose e com fibrose moderada a grave, além dessa citocina ter sido aumentada nos pacientes com as formas clínicas EHI e EHE. Abath *et al.* (2006) também observou aumento da resposta Th2 nos pacientes com as formas EHI e EHE da esquistossomose. A IL-6 medeia à expressão de citocinas Th1 e a relação entre a IL-6 e o IFN- $\gamma$  é demonstrada através do mecanismo de ação dessas citocinas. A IL-6 teria um papel protetor, através da ativação de células T produtoras de IFN- $\gamma$ , para aquisição de resistência à infecções. Porém, Rutitzky e Stadecker (2011) observaram uma relação entre os níveis de IFN- $\gamma$  e de IL-6. O estudo observou que um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  estaria relacionado com uma tentativa de minimizar os efeitos causados pelo aumento de IL-6. Essa correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6 foi encontrada no nosso estudo.

A IL-6 também tem um papel no recrutamento, ativação e sobrevivência de células T. IL-6 governa as características efectoras de vários tipos de células T, incluindo Th17, Th22 e células secretoras de IL-10. Isso pode justificar a correlação existente entre o aumento de IL-6

---

---

---

---

com o aumento de IL-10 nos pacientes com a fibrose moderada e grave e com as formas EHI e EHE da doença (FIELDING *et al.*, 2014). A indução de doença hepática grave estaria relacionada com aumento da expressão de IL-17, com polarização da resposta imune para um perfil Th1. E essa produção de IL-17 poderia estar relacionada com o papel da IL-6 (SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, a IL-6 seria responsável por um aumento do nível de IL-17, citocina fibrótica que contribui para o desenvolvimento de formas mais graves da doença. (RUTIZKY; STADECKER, 2011).

Outra citocina avaliada nesse estudo, a IL-10, é descrita como protetora na esquistossomose, impedindo a progressão da doença para formas mais graves (SOUZA *et al.*, 2012). No nosso estudo, nós encontramos altos níveis dessa citocina nos pacientes com fibrose moderada e grave, e nas formas clínicas EHI e EHE após estímulo com SEA, comparando com o controle interno. Porém não identificamos diferenças estatísticas entre os grupos, assim como o trabalho de Souza *et al.* (2012) e de Silva- Teixeira *et al.* (2004). Tem sido demonstrado altos níveis de IL-10 em pacientes infectados com formas crônicas da doença, o que pode ser uma tentativa de controle do sistema imune. A IL-10 está envolvida na regulação da resposta imunológica humana durante a infecção pelo *S. mansoni*. Além disso, a literatura mostra altos níveis de IL-10 associados com a resposta celular de pacientes durante fase crônica assintomática (OLIVEIRA-PRADO *et al.*, 2012).

Hoffmann *et al.* (2000) identificaram a importância da citocina IL-10 na prevenção da resposta Th2. O trabalho demonstrou que o aumento da IL-10 nos grupos com fibrose moderada a grave pode representar uma tentativa de modulação, através da inibição da resposta inflamatória e pró-fibrótica. A modulação da resposta imune exacerbada é essencial para promover a sobrevivência do paciente durante a infecção por esquistossomose e isso é conseguido através de vários mecanismos e um deles é através da citocina IL-10. Estudos com camundongos infectados com *S. mansoni*, deficientes de IL-10, demonstraram que as células produtoras dessa citocina regulam a doença, controlando a produção de citocinas Th1 e Th2 (CHUAH *et al.*, 2014).

IL-10 tem um papel importante na regulação do desenvolvimento da esquistossomose em resposta a produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2, e isso está de acordo com as correlações encontradas no nosso estudo. Nosso estudo, assim como o do Abath *et al.* (2006) e Wynn *et al.* (2004), demonstrou uma regulação entre citocinas Th1 e Th2. A neutralização dessa citocina foi demonstrada como um fator para o desenvolvimento de cronicidade da doença. Além disso, níveis elevados de IL-10 são requeridos uma vez que a ausência dessa

---

---

---

---

citocina poderia desencadear uma predominância de IFN- $\gamma$ , o que resultaria em uma morte rápida do indivíduo infectado (RANI *et al.*, 2012).

A IL-10 também modula a produção de IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. No nosso estudo, foi identificada uma correlação significativa entre IL-10 e IL-4 nos pacientes com fibrose grave e em pacientes com as formas EHI e EHE e entre TNF- $\alpha$  e IL-10 e entre IFN- $\gamma$  e IL-10 nos pacientes com fibrose moderada e com formas EHI e EHE. A IL-17, com sua produção estimulada pela citocina IL-6, pode contribuir para danos hepatocelulares quando da ausência de IL-10. Por isso a importância de uma correlação entre IL-10 e IL-6 (HERBERT *et al.*, 2008). Essa correlação foi identificada no nosso estudo nos pacientes com as formas EHI e EHE. Porém, Magalhães *et al.* (2004) identificaram altos níveis de IL-10 apenas em pacientes com fibrose grave. Estes dados contraditórios sugerem que outros mecanismos modulatórios da resposta envolvida no desenvolvimento da fibrose hepática devem co-existir.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a IL-13 desempenha função importante no desenvolvimento do processo fibrogênico hepático. Jesus *et al.* (2004) identificaram altos níveis dessa citocina após estimulação com SEA, porém sem diferença entre os grupos estudados. Morais *et al.* (2008), avaliando o perfil de citocinas associados com fase aguda e crônica, não identificaram diferença entre os níveis de IL-13 nos indivíduos cronicamente infectados pelo parasita e com diferentes formas clínicas da doença. No nosso estudo também não identificamos diferenças nos níveis da citocina no sobrenadante de cultura celular entre as formas clínicas. Foram identificados baixos níveis dessa citocina nos indivíduos sem fibrose, fibrose moderada e grave, e não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre eles, corroborando com o trabalho de Silva-Teixeira *et al.* (2004).

Podemos sugerir que de acordo com Abath *et al.* (2006) sugerem o aparente conflito com nossos resultados pode ser explicado através das diferenças nos desenhos do estudo, na população estudada e nas etapas de avaliação da doença. Estudos tem relatado um aumento de IL-13 na fase pré-fibrótica, correlacionando a citocina com indução de lesão fibrótica intermitente (JESUS *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2012).

Estudos realizados em camundongos infectados com *S. mansoni* e deficientes de IL-10 e IFN- $\gamma$  identificaram o papel da IL-13 na fibrogênese hepática. Esses animais desenvolveram uma exagerada resposta de IL-13 após infecção. Esta observação sugere que a IL-10 e o IFN- $\gamma$  são necessários para evitar uma resposta com perfil Th2, e consequentemente evitar a produção de IL-13, levando ao desenvolvimento da doença (WYNN *et al.*, 2004). No nosso estudo foi identificada uma fraca correlação negativa entre os indivíduos sem fibrose e uma

---

---



fraca correlação positiva entre IFN- $\gamma$  e IL-13 nos indivíduos com padrão de fibrose E+F e com a forma EHE da doença.

O perfil de produção de citocinas em pacientes com esquistossomose é bastante variável: alguns estudos mostram uma associação com perfil Th1 e outros com perfil Th2 (ABATH *et al.*, 2006). Hoffmann e Winn (2000) indicaram que ambos os perfis, Th1/Th2, são potencialmente prejudiciais, porém a polarização para uma resposta Th2 estaria relacionada com aumento da fibrose.

Portanto, diferenças nos padrões de produção e regulação das citocinas estão associadas com os diferentes padrões de fibrose e diferentes formas clínicas que ocorrem na esquistossomose mansônica (SOUZA *et al.*, 2012). A avaliação da produção de citocinas e seus receptores em estudos, em resposta a estimulação antigênica, e a associação dessa produção com os diferentes graus de fibrose periportal e com as diferentes formas clínicas é essencial para contribuir no aumento dos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos no processo, diminuindo o risco potencial para complicações. Além disso, o estudo poderá gerar conhecimentos para o desenvolvimento de novas imunoterapias para os pacientes portadores da doença.

---

---

---

---

## 9 CONCLUSÃO

No nosso estudo encontramos pacientes com baixa renda da população, níveis baixos de grau de instrução, falta de saneamento básico adequado e isso contribui para a instalação e expansão da doença ao longo do estado. Além disso, Pernambuco apresenta condições ambientais favoráveis para a expansão da esquistossomose.

A forte correlação negativa entre a IL-13 e seu receptor nos pacientes esquistossomóticos crônicos sem fibrose, sugere que no início da fibrose ocorre um aumento de IL-13, que provavelmente satura o receptor dessa citocina, e a IL-13 livre é disponibilizada no meio.

A citocina IL-13 se mantém em nível semelhante nos grupos sem fibrose e com presença moderada e grave da fibrose periportal. Provavelmente a IL-13 mantém-se sempre em níveis regulares para a produção contínua da fibrose.

A presença de IFN- $\gamma$  após estímulo com SEA, com diferença estatística ao se comparar apenas com o meio (sem estímulo) e sem diferenças entre os grupos, sugere uma proteção anti-fibrótica presente em todos os grupos.

A correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Th1), IL-4 e IL-10 (Th2), nos grupos C+D e E+F e nas formas EHI e EHE, sugere que existe presença concomitante de resposta Th1 e Th2, nesses dois grupos de padrão de fibrose periportal (moderada a grave) e nas diferentes formas clínicas, atuando no processo inflamatório e ao mesmo tempo, protegendo o pacientes de um processo inflamatório letal. As correlações encontradas onde a citocina IL-2 está presente (IFN- $\gamma$  x IL-2; TNF- $\alpha$  x IL-2; IL-2 x IL-4; IL-2 x IL-10) demonstra e confirma a ação dessa citocina no direcionamento da resposta Th1 e/ou Th2, no grupo de moderada fibrose.

---

---

---

---

## 10 PERSPECTIVAS

Apesar de não poder concluir a respeito da correlação que inicialmente é negativa no grupo sem fibrose e posteriormente se torna positiva na fibrose grave, entre o IFN- $\gamma$  e IL-13, é importante salientar que estudos direcionados às essas duas citocinas podem indicar um novo mecanismo de regulação.

Outros mecanismos envolvendo o desenvolvimento da fibrose hepática devem co-existir, principalmente aqueles em que a IL-10 e IL-6 estejam envolvidas. Nesse caso não há a presença precoce dessas citocinas, mas provavelmente elas atuam a partir da fibrose moderada e continua na fibrose grave.

Faz-se necessário, porém, estudos em populações maiores, onde se possa obter maior entendimento do comportamento das citocinas e seus receptores nos pacientes esquistossomóticos com diferentes graus de fibrose periportal e com as diferentes formas clínicas da doença.

---

---

---

---

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.
- ABBAS, K.A. *Imunologia celular e molecular*. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- ALVES-OLIVEIRA, L.F. *et al.* Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* in Humans. *Infect. Immun.*, Washington, v. 74, n. 2, p. 1215-1221, 2006.
- ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 31, p. 656-663, 2009.
- ANDREWS, A.L. *et al.* IL-13 receptor  $\alpha 2$ : A regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J. Allergy clin. Immunol.*, St Louis, v. 118, n.4, p. 858-865, 2006.
- AMARAL R.S.; TAIUIL, D.D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, p. 79-85, 2006.
- ANGULO, P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J.Med.*, Boston, v. 346, p. 1221-1231, 2002.
- ANTHONY, B. *et al.* Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. *Parasit. Vectors*, London, v. 3, n. 60, p. 60-67, 2010.
- ASARNOW, D.E.; SINGH, R. Segmenting the Etiological Agent of Schistosomiasis for High-Content Screening. *IEEE Trans. Med. Imaging*, New York, v. 32, n. 6, p. 1007-1018, 2012.
- BARBOSA, C.S.; SILVA, C.B.; BARBOSA, F.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 30, n.6, p. 609-616, 1996.
- BARBOSA, F.S.; GONÇALVES, J.F.; MELO, M.C.V. Formas Hepatosplênicas da Esquistossomose Mansônica no Interior do Nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, v. 11, n.2, p. 325-331, 1995.
- BARRETO, A.V.S. *Associação entre marcadores biológicos e os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica*. Recife: Fiocruz, 2011.
- BASTOS, J.L.D.; DUQUIA, R.P. Um os delineamentos mais empregados em epidemiologia: estudo transversal. *Scientia Medica*, Rio Grande do Sul, v. 17, n. 4, p. 229-232, 2007.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 155, n. 2, p. 209-218, 2005.
- 
-

---

---

BICHLER, K.H. *et al.* Schistosomiasis: a critical review. *Curr. Opin. Urol.*, London, v. 11, p. 97-101, 2001.

BLUM, A.M. *et al.* IL-6-Deficient Mice Form Granulomas in Murine Schistosomiasis That Exhibit an Altered B Cell Response. *Cell. Immunol.*, Orlando, v. 188, p. 64-72, 1998.

BONA, C.A.; REVILLARD, J-P. Cytokines and Cytokines Receptors: Physiology and Pathological Disorders. Amsterdam: *Overseas publishers association*, 2000.

BRANDT, C.T. *et al.* Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. *Rev. col. bras. cir.*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 5, p. 333-337, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7 ed. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Casos confirmados da esquistossomose*. Brasília, 2011. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1551](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551)> Acesso em: 15 mar. 2013.

BURCHARD, G.D. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in Senegal: lack of correlation between liver morphology in ultrasound and connective tissue metabolites in serum. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-241, 1998.

BURKE, M.L. *et al.* Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.31, p.163-176, 2009.

CALDAS, I.R. *et al.* Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic of the infection. *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 108, p. 109-117, 2008.

CHEN, M.D.W. *et al.* Matrix metalloproteinase 8 contributes to solubilization of IL-13 receptor  $\alpha 2$  *in vivo*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St Louis, v. 122, p. 625-632, 2013.

CHEEVER, A.W.; HOFFMANN, K.F.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. today*, Amsterdam, v. 21, n.9, p. 465-466, 2000.

CHIARAMONTE, M.G. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 104, n.6, p.777-785, 1999.

CHIARAMONTE, M.G. *et al.* IL-13 Is a Key Regulatory Cytokine for Th2 Cell-Mediated Pulmonary Granuloma Formation and IgE Responses Induced by *Schistosoma mansoni* Eggs. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 162, p. 920-930, 1999.

CHIARAMONTE, M.G. *et al.* Studies of murine Schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology*, Baltimore, v. 34, n. 2, 1 p. 273-282, 2001.

---

---

---

---

CHIARAMONTE, M.G. *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor  $\alpha 2$  during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J. Exp. Med.*, New York, v. 197, n.6, p. 687-701, 2003.

CHITSULO, L. *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 77, p. 41-51, 2000.

CHUAH, C. *et al.* Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 30, n. 3, p. 1-10, 2014.

CICLO de vida do *Schistosoma mansoni*. Disponível em:

<<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/esquistossomose/index.php/>> Acesso em: 10 de abr. de 2013.

DAINES, M.O.; HERSHEY, G.K. A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor  $\alpha 2$  and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J. biol. chem.*, Baltimore, v. 22, p. 10387-10393, 2002.

DAINES, M.O. *et al.* Level of Expression of IL-13R $\alpha 2$  Impacts Receptor Distribution and IL-13 Signaling. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 176, p. 7495-7501, 2006.

DAVID, M.D.; BERTOGLIO, J.; PIERRE, J. Functional characterization of IL-13 receptor  $\alpha 2$  gene promoter: a critical role of the transcription factor STAT6 for regulated expression. *Oncogene*, Basingstoke, v. 22, p. 3386-3394, 2003.

DAVID, M. *et al.* Induction of the IL-13 receptor  $\alpha 2$ -chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene*, Basingstoke, v. 20, p. 6660-6668, 2001.

DESSEIN, A. *et al.* Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gama receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, Chicago, v. 65, p. 709-721, 1999.

DOMINGUES, A.L.C. *Schistosoma mansoni* & *Esquistossomose*: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008.

DOMINGUES, A.L.C.; SILVA, P.C.V. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. *Epidemiol. serv. saúde*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 327-336, 2011.

ERKO, B. *et al.* Efficacy and side effects of Praziquantel in the treatment of *Schistosomiasis mansoni* in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary School, Wondo Genet, Southern Ethiopia. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, Singapore, v. 2, n.3, p. 235-239, p. 2012.

ESPÉCIE do gênero *Biomphalaria*, vetor da esquistossomose. Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1295&sid=32&tpl=printerview>> Acesso em: 10 abr. 2013.

---

---

- 
- 
- FALLON, P.G. *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. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 164, p. 2585-2591, 2000.
- FALLON, P.G. *et al.* Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect. immun.*, Washington, v. 68, n. 10, p. 6005-6011, 2000.
- FAVRE, T.C. *et al.* Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.*, Uberaba, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001.
- FERRARI, M.L.A. *et al.* Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull. World Health Org.*, Geneva, v. 81, n. 3, p. 190-196, 2003.
- FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. *Rev. Patol. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 67-74, 2007.
- FIELDING, C.A. *et al.* Interleukin-6 Signaling Drives Fibrosis in Unresolved Inflammation. *Immunity*, Cambridge, v. 40, p. 40–50, 2014.
- FITTIPALDI, J. *Relação entre níveis de imunoglobulinas – IgE e IgG – e a forma clínica da esquistossomose mansônica em pacientes do município de Padre Paraíso, Minas gerais.* Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- FONTES, G. *et al.* Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.*, Uberaba, v. 36, n. 5, p. 625-628, 2003.
- FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, Philadelphia, v. 134, p. 1655-69, 2008.
- GAZZINELLI, A. *et al.* Socioeconomic Determinants of Schistosomiasis in a Poor Rural Area in Brazil. Running short title: Socioeconomic Determinants of Schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 99, p. 260-271, 2006.
- GRANT, A.V. *et al.* Functional Polymorphisms in IL13 Are Protective against High *Schistosoma mansoni* Infection Intensity in a Brazilian Population. *PLoS one*, San Francisco, v. 7, p. 1-6, 2012.
- GREENBERG, R.M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology*, London, v. 3, p. 1-13, 2013.
- HERBERT, D.B.R. *et al.* IL-10 and TGF- $\beta$  Redundantly Protect against Severe Liver Injury and Mortality during Acute Schistosomiasis. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 181, p. 7214-7220, 2008.
- 
-

- 
- 
- HENRI, S. *et al.* Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 169, n. 2, p. 929-936, 2002.
- HOLGATE, S.T. Trials and tribulations in identifying new biologic treatments for asthma. *Trends in immunol.*, Oxford, v. 33, p. 238-246, 2012.
- HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A. IL-10 and Danger of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 164, n. 12, p. 6406-6416, 2000.
- INGRAM, J.L.; KRAFT, M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J. allergy clin. immunol.*, St. Louis, v. 130, p. 829-842, 2012.
- JANEWAY, C.A. *et al.* *Imunidade Inata*. 7. São Paulo: Artmed, 2010.
- JESUS, A.R. *et al.* Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. *Infect. immun.*, Washington, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, 2004.
- JIAO, J.; FRIEDMAN, S.L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 223-29, 2009.
- JORDAN, P.; WERBE, G. *Human Schistosomiasis*. Oxford: Illinois, 1969.
- KANAMURA, H.Y. *et al.* ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 255-261, Rio de Janeiro, 2003.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43. 2003.
- KHALIL, R.M.A. *et al.* Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice. *Immunology*, Oxford, v. 89, p. 256-261, 1996.
- LEAL NETO, O.B. *et al.* Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, 2013.
- LIU, Y. *et al.* IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. *Front. immunol.*, Lausanne, v.116, n.3, 2012.
- MAGALHÃES, A. *et al.* Cytokine Profile Associated with Human Chronic Schistosomiasis Mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 21-26, 2004.
- MANNON, P.; REINISCH, W. Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. *Gut.*, London, v. 61, p. 1765-1773, 2012.
- MANZELLA, A. *et al.* Schistosomiasis of the liver. *Abdom. Imaging*, Oxford, v. 33, n. 2, p. 144-150, 2008.
- 
-



MATTOS, A.A.; DANTAS-CORREA, E.B. *Tratado de Hepatologia*. 1. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MBOW, M. *et al.* T - Helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. *J. Infect. Dis.*, Oxford, v. 207, p. 186-195, 2008.

MENTINK-KANE, M.M. *et al.* IL-13 receptor - 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v.101, n. 2, p. 586-590, 2004.

MENTINK-KANE, M.M. *et al.* Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R<sub>2</sub>. *Gastroenterology*, Philadelphia, v.141, p. 2200–2209, 2011.

MONTENEGRO, S.M.L. *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-g and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J. Infect. Dis.*, Oxford, v. 179, p. 1502-1514, 1999.

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

MORAIS, C.N.L. *et al.* Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n.4, p. 460-66, 2010.

MOSMANN, T.R. *et al.* Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp.*, Amsterdam, v. 204, p. 148-154, 1997.

MWATHA, J.K. *et al.* High Levels of TNF, Soluble TNF Receptors, Soluble ICAM-1, and IFN-  $\gamma$ , but Low Levels of IL-5, Are Associated with Hepatosplenic Disease in Human Schistosomiasis Mansoni. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 160, p. 1992-1999, 1998.

NASCIMENTO, G.L.; OLIVEIRA, M.R.F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Oxford, v. 108, p. 29-36, 2014.

NEVES, D.P. *et al.* *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

NEWCOMB, D.C. *et al.* Human T<sub>H</sub>17 cells express a functional IL-13 receptor and IL-13 attenuates IL-17A production. *J. allergy clin. immunol.*, St Louis, v. 127, p. 1006-1013, 2011.

OGATA, H. *et al.* Regulation of Interleukin-13 Receptor Constituents on Mature Human B Lymphocytes. *J. biol. chem.*, Baltimore, v. 273, n. 6, p. 9864-9871, 1998.

OH, C.K.; GEBA, G.P.; MOLFINO, N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur. Respir. Rev.*, Denmark, v. 19, n.115, p. 46-54, 2010.

---

---

---

---

OLIVEIRA, L.F.A. *et al.* Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* in Humans. *Infect. immun.*, Washington, v. 74, n. 2, p. 1215–1221, 2006.

OLIVEIRA, R.R. *et al.* Factors Associated with Resistance to *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area of Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v. 86, p. 296–305, 2012.

OLIVEIRA-PRADO. *et al.* Cytokine profile, proliferation and phosphorylation of ERK1/2 and Akt in circulating mononuclear cells from individuals during the chronic intestinal phase of *Schistosomiasis mansoni* infection. *BMC Infect. Dis.*, London, v. 12, p.380, 2012.

OLLIARO, P.L. *et al.* A Multicentre Randomized Controlled Trial of the Efficacy and Safety of Single-Dose Praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for Treating Intestinal Schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. *PloS. Negl. Trop. Dis.*, San Francisco, v. 5, n. 6, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Schistosomiasis*. Geneva, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>> Acesso em: 15 mar. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Schistosomiasis*. Geneva, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/en/>> Acesso em: 02 abr. 2011.

PANDYA, H. *et al.* An interleukin 13 receptor  $\alpha 2$ -specific peptide homes to human Glioblastoma multiforme xenografts. *Neuro. oncol.*, Oxford, v. 14, n. 1, p. 6-18, 2010.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The Immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.*, London, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PEARCE, E.J. *et al.* Pillars Article: Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of TH2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 189, p. 1104-1111, 2012.

PEREIRA, A.P.B. *et al.* The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, 2010.

PEREIRA, W.R. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 34-41, 2009.

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. *Epidemiol. serv. saúde*, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

PORTAL SÃO FRANCISCO. SCHISTOSOMA *mansoni*, macho e fêmea durante a cópula. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-platelmintos/filo-platelmintos-11.php>> Acesso em: 10 abr. 2013.

---

---

---

---

QASEEM, A.S. *et al.* Linking surfactant protein SP-D and IL-13: implications in asthma and allergy. *Mol. immunol.*, Oxford, v. 54, n. 1, p. 98-107, 2013.

RAMALHO, F.S. *et al.* Regeneração hepática. Algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 8, p. 177-189, 1993.

RANI, R. *et al.* IFN- $\gamma$ -Driven IDO Production from Macrophages Protects IL-4R-Deficient Mice against Lethality during *Schistosoma mansoni* Infection. *Am. J. Pathol.*, New York, v. 180, n. 5, 2012.

RESENDES, A.P.C.; SOUZA, S.R.; BARBOSA, C.S. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000. *Cad. Saúde Pública.*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1392 – 1401, 2005.

RICHTER, J. *et al.* Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-56, 2001.

RIDI, R.E. *et al.* Influence of interleukin-2 and interferon gamma in murine schistosomiasis. *Cytokine*, San Diego, v. 33. p. 281-288, 2006.

RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v. 41, p. 2677-2687, 2011.

SANTOS, G.T. *et al.* Reprodutibilidade da classificação ultra-sonográfica de Niamey na avaliação da fibrose periportal na esquistossomose mansônica. *Radiol. Bras.*, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 377-381, 2007.

SILVA, F.L. *Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com Schistosoma mansoni*. Recife: Fiocruz, 2008.

SIVAPRASAD, U. *et al.* IL-13Ra2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation. *J. immunol.*, Bethesda, v. 185, p. 6802-6808, 2010.

SILVA, L.C.; CHIEFFI, P.P.; CARRILHO, F.J. Schistosomiasis mansoni – Clinical feature. *Gastroenterol. Hepatol.*, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 30-39, 2005.

SILVA, P.C.V.; LEAL, T.V.; DOMINGUES, A.L.C. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 46. n. 4, p. 472-477, 2013.

SILVA-TEIXEIRA, D.N. Gender-Related Cytokine Patterns in Sera of Schistosomiasis Patients with Symmers Fibrosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v. 11, n. 3, p. 627, 2004.

SOUZA, F.P.C. *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev. Bras. clin. med.*, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

---

---

---

---

SOUZA, R.P. *et al.* Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to Schistosomamansoni Infection. *J. Parasitol. Res.*, New York, v. 2012, p. 1-10, 2012.

STAVITSKY, A.B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect. Immun.*, Washington, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2004.

TABATA, Y.; HERSHEY, G.K.K. IL-13 receptor isoforms: Breaking Through the Complexity. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, Philadelphia, v. 7, p. 338-345, 2007.

TALAAT, R. *et al.* Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S. mansoni*-infected Egyptian patients. *Parasitol. Res.*, Berlin, v. 101, p. 289-299, 2007.

UTZINGER, J. *et al.* Current Progress in the Development and Use of Artemether for Chemoprophylaxis of Major Human Schistosome Parasites. *Curr. Med. Chem.*, Schiphol, v.8, p. 1841-1859, 2001.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.F. Citokines: a review. *Rev. Bras. alerg. imunopatol.*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

ZHENG, T. *et al.* IL-13 Receptor-2 Selectively Inhibits IL-13-Induced Responses in the Murine Lung. *J. Immunol.*, Bethesda, v. 180, p. 522-529, 2008.

ZHENG, T. *et al.* Cytokine regulation of IL-13R $\alpha$ 2 and IL-13R $\alpha$ 1 in vivo and in vitro. *J. allergy clin. immunol.*, St Louis, v. 111, n. 4, p. 720-728, 2003.

WANG, W.W.; WANG, L.; LIANG, Y-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *J. Parasitol. Res.*, New York, v. 111, p. 1871-1877, 2012.

WARREN, K.S. The pathogenesis of "clay-pipestem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v. 49, p. 477-489, 1966.

WARREN, K.S. Hepatosplenic schistosomiasis mansoni: an immunologic disease. *N.Y. Acad. Med.*, Philadelphia, v. 51, n. 545, 1975.

WAYNE, W. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud.* México: Editorial Limusa, 1995.

WILSON, M.S. *et al.* IL-13R $\alpha$ 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway hyperreactivity, and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 117, n. 10, p. 2941-2951, 2007.

WILSON, M.S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell. Biol.*, London, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.

WIKIPEDIA. *Biomphalaria glabrata*. 2013. Disponível em:  
<[http://pt.wikipedia.org/wiki/Biomphalaria\\_glabrata](http://pt.wikipedia.org/wiki/Biomphalaria_glabrata)> Acesso em: 10 abr. 2013.

---

---

WOOD, N. *et al.* Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor  $\alpha 2$ . *J. Exp. Med.*, New York, v. 197, p. 703–709, 2003.

WU, A. *et al.* NFAT and AP1 are essential for the expression of a glioblastoma multiforme related IL-13R $\alpha 2$  transcript. *Cell. Oncol.*, Amsterdam, v. 32, p. 5-6, 2010.

WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm. *Nat. Rev.*, London, v. 4, p. 583-594, 2004.

WYNN, T.A. *et al.* Immunopathogenesis of Schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, Oxford, v. 201, p. 156-167, 2004.

WYNN, T.A. IL-13 Effector functions. *Annual review immunology*, USA, v. 21, p. 425-436, 2003.

WYNN, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 117, n. 3, p. 524-529, 2007.

WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature med.*, New York, v. 18, n. 7, p. 1028-1040, 2012.

YOSHIKAWA, M. *et al.* TNF- $\alpha$  and IL-4 regulate expression of IL-13 receptor  $\alpha 2$  on human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Diego, v. 312, p. 1248-1255, 2003.

---

---

---

---

## APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

Eu, \_\_\_\_\_  
declaro que aceito participar do estudo científico: **“AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR ANTAGONISTA DE IL-13 (IL-13Ra2) E SUA RELAÇÃO COM OS GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA”**. Fui informado (a) que esta pesquisa tem como objetivo analisar a participação de um receptor de citocina (substância que temos no sangue e que faz parte do sistema de defesa do nosso organismo) e sua relação com a gravidade da esquistossomose. Minha participação nesse estudo não vai me beneficiar diretamente, mas os resultados desta pesquisa poderão contribuir para um melhor acompanhamento no tratamento dos pacientes, além de contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas imunoterapias para os pacientes portadores da doença. Fui informado que a minha participação neste estudo compreenderá exames clínicos e laboratoriais para melhor compreensão da doença. Meus dados coletados serão, registrados, sem expor meu nome ou me identificar garantindo, portanto, meu anonimato. Também fui informado (a) que para dosagem das substâncias que os pesquisadores deste estudo querem analisar, será necessário a coleta de uma amostra equivalente a uma colher de chá do meu sangue (5ml), através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Os riscos de retirar sangue são dor e formação de hematoma local. Esse material será enviado para o laboratório do CPqAM/FIOCRUZ para a realização dos referidos testes, serão guardados podendo ser utilizados em pesquisas posteriores e eu tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de pressão. Minha participação é voluntária e eu poderei desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem com isso, ter nenhum prejuízo do meu atendimento/ acompanhamento no serviço onde sou atendido (a). Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome.



## APÊNDICE B- Formulário de Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### FICHA CADASTRAL DOS PACIENTES DO PROJETO ESQUISTOSSOMOSE

1. Nome: \_\_\_\_\_  
Prontuário HC: \_\_\_\_\_ Registro na pesquisa: \_\_\_\_\_ Data coleta: \_\_\_\_\_
2. Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_
3. Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_
4. Telefone: \_\_\_\_\_
5. Município de nascimento: \_\_\_\_\_ ( ) Recife ( ) Região Metropolitana  
( ) Interior PE ( ) Outros
6. Sexo: (1) Masculino (2) Feminino
7. Escolaridade: \_\_\_\_\_  
( ) Nenhuma ; ( ) Ensino fundamental incompleto ; ( ) Ens. Fundam. Completo ; ( ) Ens. Médio incompleto ; ( ) Ens. Médio completo ; ( ) Ens. Superior incompleto ; ( ) Ens. Sup. completo
8. Situação trabalhista: \_\_\_\_\_  
(1) Empregado (2) Desempregado (3) Aposentado (4) Do lar (5) Outro
9. Renda familiar: ( ) menor que 1 salário ; ( ) 1 a 2 ; ( ) 3 a 4 ; ( ) mais que 4 ; ( ) não quis dizer
10. Condições de moradia: ( ) casa própria ; ( ) alugada ; ( ) de parentes ; ( ) outros
11. Saneamento básico: ( ) SIM ; ( ) NÃO
12. Estado marital: ( ) Solteiro(a) ; ( ) Casado(a) ; ( ) Separado(a) ou divorciado(a)
13. Possui filhos: ( ) SIM ; ( ) NÃO Quantidade vivos: \_\_\_ Mortos: \_\_\_  
Causa: \_\_\_\_\_
14. Forma de contaminação : \_\_\_\_\_
15. Tratamento: ( ) SIM: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ; ( ) NÃO
16. Banho de rio: ( ) SIM. Quando: \_\_\_\_\_ ; ( ) NÃO  
Onde: \_\_\_\_\_
17. USG: Graus de fibrose  
Niamey:  
Média fibrose  
Baço longitudinal  
Veia Porta





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

18. Exames  
laboratoriais:

---

---

---

19. Parasitológico de fezes:  
Hoffman: \_\_\_\_\_  
Kato-Katz: \_\_\_\_\_

20. TRANSPLANTES/ USO DE IMUNOSUPRESSORES: ( )SIM ; ( )NÃO

21. Esplenectomia: ( )SIM ; ( )NÃO

22. Presença de outras hepatopatias: ( )SIM ; ( )NÃO

23. HEPATITE B: ( )SIM ; ( )NÃO

24. HEPATITE C: ( )SIM ; ( )NÃO

25. Doença renal crônica: ( )SIM ; ( )NÃO

26. Ingestão de álcool: ( )SIM ; ( )NÃO

27. Tabagismo: ( )SIM ; ( )NÃO

Outros:  
Observações:

---

---

---

---

---



---

**ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz**


**Título do Projeto:** “Avaliação do papel do receptor antagonista de IL-13 (IL-13Ra2) e sua relação com os graus de fibrose hepática na Esquistossomose Mansônica”.

**Pesquisador responsável:** Anna Lígia Figueiredo.

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 19/06/12

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 15/12

**Registro no CAAE:** 04304912.8.0000.5190

**PARECER Nº 23/2012**

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 05 de setembro de 2015. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 05 de setembro de 2012.

Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Observação:  
Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 05/09/2013.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br





Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** “Avaliação da participação do receptor antagonista de IL-13 (IL-13ra2) na relação com os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica”.

**Pesquisador responsável:** Anna Lígia Figueiredo.

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 19/09/2013

**Registro no CAAE:** 04304912.8.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 449.871

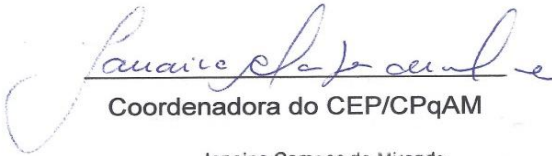
#### PARECER


O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de novembro de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de novembro de 2013.

  
Coordenadora do CEP/CPqAM

  
Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ



**Título do Projeto:** “Esquistossomose mansônica humana: avaliação do receptor antagonista de IL-13 (IL-13 $\alpha$ 2) e da resposta imune celular”.

**Pesquisador responsável:** Anna Lígia Figueiredo.

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 22/04/2014

**Registro no CAAE:** 04304912.8.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 645.130

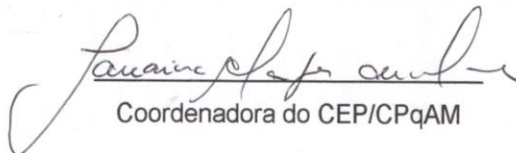
### PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de maio de 2017.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de maio de 2014.



Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ