

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

SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SM15 COM POTENCIAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE PACIENTES INFECTADOS COM *Schistosoma mansoni*

RECIFE
2015

SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SM15 COM POTENCIAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE PACIENTES INFECTADOS COM *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada ao diagnóstico e controle de doenças infecciosas, parasitárias e crônicas

Orientadores: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Ph.D.

Carlos Gustavo Regis da Silva, Ph.D.

RECIFE

2015

SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SM15 COM POTENCIAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE PACIENTES INFECTADOS COM *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

DATA DE APROVAÇÃO ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Orientadora - Fiocruz-PE

Dr^a Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Departamento de Imunologia - Fiocruz-PE

Dr^a Virgínia Maria Barros de Lorena
Departamento de Imunologia - Fiocruz-PE

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

O48p Oliveira, Sávio Augusto Vieira de.
Produção da proteína recombinante Sm15 com potencial para o diagnóstico de pacientes infectados com *Schistosoma mansoni* / Sávio Augusto Vieira de Oliveira. - Recife: [s.n.], 2015.
86 p. : ilus.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes; co-orientador: Carlos Gustavo Regis da Silva.

1. Esquistossomose - diagnóstico. 2. Esquistossomose - imunologia. 3. Testes Imunológicos - classificação. 4. Testes Imunológicos - métodos. 5. Proteínas Recombinantes – isolamento & purificação. 6. Proteínas Recombinantes – uso diagnóstico. 7. Proteínas Recombinantes - imunologia I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Silva, Carlos Gustavo Regis da. III. Título.

CDU 616.995.122

Aos meus pais e à minha irmã, por permanecerem me apoiando durante a realização de todo meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, força e saúde para realizar as conquistas que obtive até hoje.

Aos meus pais, Mônica e Jairo, e irmãos, Lara e Léo, pelo exemplo que me deram, pelo constante incentivo, por estarem presentes em todos os momentos, por cada puxão de orelha, por cada jogo do Sport, por cada noite sem dormir, por cada almoço de família, por cada exemplo, por todos os sorrisos, todas as lágrimas, por mostrarem que através do trabalho e do esforço, eu conseguiria atingir meus objetivos, vocês são o melhor de mim e eu sempre buscarei ser o melhor por vocês.

Aos meus mais novos amigos, Ross safada, Hector, Renan's (chefe), Lali e os "velhos" novos amigos Râamulo, Juana, Klaris falsa, Amandinha, que tive o imenso prazer de conhecer, me aproximar e reaproximar durante o período inicial do mestrado. Gostaria de dizer que foi maravilhoso dividir isso com vocês, e que o mestrado não seria tão legal se vocês não viessem de anexo com ele.

As minhas queridas amigas Gabinha, Cami, Netinha, Pataxó e Lisa's por sempre estarem comigo desde os primeiros momentos da graduação, pelos conhecimentos compartilhados e preocupações divididas, pelos conselhos que me foram dados, que não foram poucos, e por todos os momentos de alegria e risadas que nós vivemos dentro e fora da vida acadêmica. Vocês tornam muito menor a pressão e barra que é o mestrado!!!

Aos meus amigos do colégio contato, Daya, Lucas Saukerl (mago) e Quel (mô), além de todos os outros que participaram no nosso grupo, sempre é muito divertido com vocês, não importa o que iremos fazer, seja ficar no posto, ir a praia, estudar, debater, ir pro cinema lotado do Boa Vista... tudo é divertido com vocês, obrigado por estarem na minha vida.

Aos meus orientadores Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva e Dr. Christian Robson de Souza Reis pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, por terem me ajudado a enfrentar todas as adversidades e por cobrarem sempre o melhor de mim.

À Roberto Werkhäuser pelos conhecimentos que me foram passados e por ratificar minha busca por uma postura questionadora e coerente dentro do laboratório.

À Fiocruz Pernambuco e pela organização e infraestrutura oferecida.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela influência direta de seus trabalhos nos nossos resultados.

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas pelos sequenciamentos.

À FACEPE, pelo apoio financeiro.

À equipe Dr^a Ana Lúcia Coutinho Domingues, médica do ambulatório de Esquistossomose do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela contribuição na seleção e classificação clínica dos participantes deste estudo.

E aos portadores da esquistossomose que participaram deste estudo.

“Wait for it...”

Barney Stinson

OLIVEIRA, Sávio Augusto Vieira. Produção da proteína recombinante Sm15 com potencial para o diagnóstico de pacientes infectados com *Schistosoma mansoni*. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

O exame parasitológico por Kato-Katz ainda é considerado o padrão ouro no diagnóstico da esquistossomose mansônica, entretanto, este apresenta baixa sensibilidade para utilização em inquéritos epidemiológicos. Além disso, as técnicas de diagnóstico imunológico, apresentam reações cruzadas com outros helmintos, protozoários e até bactérias como ocorre com a utilização dos extratos brutos do parasita. Nesse sentido, salientamos que Abath *et al.* identificaram um peptídeo de 15kDa denominado Sm15, que apresentou uma boa reatividade com soros de animais infectados pelo verme e, portanto, possui potencial para abordagens imunoproláticas e para testes diagnósticos. Neste estudo obtivemos o polipeptídeo recombinante Sm15 em *Escherichia coli* e verificamos seu potencial para realização do diagnóstico a partir de amostras de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da esquistossomose. Através de ELISA constatamos que o Sm15 apresentou maior reatividade frente a soros de pacientes esquistossomóticos, quando comparado ao extrato bruto SEA ($P=0.0043$). O Sm15 ainda demonstrou melhor desempenho ao apresentar maiores valores de sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva ROC ($P=0.0030$). Além disso, o Sm15 foi capaz de diferenciar pacientes esquistossomóticos quanto à forma clínica, aguda ou crônica ($P=0.0007$). Os resultados obtidos neste estudo indicam, além de ratificar o potencial diagnóstico apresentado pelo polipeptídeo Sm15, que o mesmo poderá ser capaz de gerar uma alternativa de imunodiagnóstico de elevada acurácia, suprimindo assim as lacunas existentes com relação aos testes parasitológicos e sorológicos atualmente disponíveis. Além disso, possibilitará o diagnóstico precoce da esquistossomose, realização de inquéritos epidemiológicos em áreas de baixa endemicidade, impedindo assim a evolução da doença para formas clínicas de maior gravidade.

Palavras-chave: Esquistossomose, Imunodiagnóstico, polipeptídeo recombinante.

OLIVEIRA, Sávio Augusto Vieira. Production of the recombinant protein Sm15 with potential for the diagnosis of patients infected with *Schistosoma mansoni*. 2015. Dissertation (Master's degree of Bioscience and Biotechnology for Health) - Research Center Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2015.

ABSTRACT

The parasitological examination by Kato-Katz still considered the gold standard in the diagnosis of schistosomiasis, however, it has low sensitivity for use in epidemiological surveys. Moreover, the techniques of immunological diagnosis, have cross-reactivity with other helminth, protozoa and even bacteria as occur with the use of crude parasite extracts. In this regard, we note that Abath and colleagues identified a 15kDa peptide termed SM15, which showed good reactivity with sera from animals infected by the worm, and therefore has potential immunoprophylactic and diagnostic testing approaches. In this study we obtained the recombinant polypeptide in *Escherichia coli* SM15 and check its potential for making the diagnosis from samples of patient sera with different clinical manifestations of schistosomiasis. By ELISA we found that the SM15 showed higher reactivity towards sera from schistosomiasis patients, when compared to the crude extract SEA ($P = 0.0043$). The SM15 also demonstrated better performance by presenting higher sensitivity, specificity, and area under the ROC curve ($P = 0.0030$). In addition, the SM15 was able to differentiate schistosomiasis patients about the clinical presentation, acute or chronic ($P = 0.0007$). The results of this study indicate not only ratifies the diagnostic potential presented by the SM15 polypeptide, that it may be able to generate an immunodiagnostic alternative high accuracy, thereby supplying the gaps in the parasitological and serological tests currently available. Also, it enables the early diagnosis of schistosomiasis, carrying out epidemiological surveys in low endemicity areas, thereby preventing disease progression to more severe clinical forms.

Keywords: schistosomiasis, Immunodiagnostic, recombinant polypeptide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial da Esquistossomose mansônica	19
Figura 2 - Expansão da transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil	19
Figura 3 - Hospedeiros intermediários da Esquistossomose	20
Figura 4 - Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil	21
Figura 5 - Formas evolutivas do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 6 - Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 7 - Diagnóstico diferencial da esquistossomose mansônica em suas díspares fases evolutivas	28
Figura 8 - Sequência da proteína precursora ‘major tegumental antigen SM15’	36
Figura 9 - Representação diagramática do tegumento do verme <i>Schistosoma mansoni</i>	37
Figura 10 - Sequência do gene GSM70 codificante para o polipeptídeo Sm15	46
Figura 11 - Amplificação do fragmento gênico correspondente a Sm15	47
Figura 12 - Purificação do fragmento Sm15.408 amplificado do gene GSM70	47
Figura 13 - Confirmação de clonagem através da amplificação do fragmento gênico Sm15 de colônias bacterianas	48
Figura 14 - Alinhamento dos fragmentos gênicos Sm15 (NCBI) e do Sm15 obtido na construção ‘Sm15.pGEM-T Easy’	48
Figura 15 - Alinhamento proteico do gene GSM70 (NCBI) e ‘Sm15.pGEM-T Easy’ traduzidos <i>in silico</i>	49
Figura 16 - Histograma representativo dos ‘matches’ obtidos pelo BLAST	49
Figura 17 - Características das sequências que geraram ‘matches’ no BLAST	50
Figura 18 - Digestão dupla com as enzimas NdeI e EcoRI	51
Figura 19 - Esquemas de digestão para certificação de clonagem da construção ‘Sm15.pTYB21’	51
Figura 20 - Esquema de digestão para certificação de clonagem da construção ‘Sm15.pRSETA’	52
Figura 21 - Padronização para indução da proteína recombinante Sm15i	53
Figura 22 - Produção em larga escala da proteína recombinante Sm15i	54
Figura 23 - Produção em larga escala da proteína recombinante 6His-Sm15	54

Figura 24 - Purificação da proteína recombinante Sm15i através do sistema IMPACT	56
Figura 25 - Comparação de peso molecular entre Sm15i e 6His-Sm15	56
Figura 26 - Localização do polipeptídeo Sm15.408 na proteína precursora	57
Gráfico 1 – Comparação através de ELISA entre as reatividades do polipeptídeo recombinante Sm15 e do SEA frente a soros de pacientes esquistossomóticos de diversas formas clínicas da doença	61
Gráfico 2 – Diferenciação através de ELISA de pacientes esquistossomóticos com as formas clínicas aguda e crônica, utilizando como antígeno o polipeptídeo recombinante Sm15	61
Gráfico 3 – Diferenciação através de ELISA de pacientes esquistossomóticos com as formas clínicas aguda e crônica, utilizando como antígeno o SEA	62
Figura 27 – Valores de sensibilidade, especificidade e likelihood ratio calculadas para os antígenos Sm15 e SEA	62
Figura 28 – Características estatísticas das curvas ROC estabelecidas para os antígenos Sm15 e SEA	63
Gráfico 4 – Sobreposição das curvas ROC estabelecidas para os ELISA utilizando os antígenos Sm15 e SEA	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mistura para PCR convencional do polipeptídeo Sm15, destacando as diferenças entre a utilização para os diferentes tipos de enzimas polimerase Platinum Pfx e Taq Platinum respectivamente	41
Tabela 2 - Características demográfico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo	58
Tabela 3 - Características geográfico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo	58
Tabela 4 - Características socioeconômicas dos indivíduos incluídos neste estudo	59
Tabela 5 - Variações realizadas durante o processo de padronização do ELISA - Sm15	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Antígeno Aniônico Circulante
ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i>
ACC	Antígeno Catiônico Circulante
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CEF6	Fração Catiônica 6
cDNA	<i>Complementary Desoxiribonucleic Acid</i>
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphates</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EH	Esquistossomose Hepática
EHE	Esquistossomose Hepatoesplênica
EHI	Esquistossomose Hepatointestinal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FPP	Fibrose Periportal
GGT	Gama Glutamil Transferase
HC	Hospital das Clínicas
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
LAMP	<i>Loop mediated isothermal AMPLification</i>
LB	<i>Luria-Bertani broth or media</i>
LIBM	Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular
MSA1	Antígeno Sorológico Maior 1
NdeI	Enzima de Restrição
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
opg	Ovos Por Grama de fezes
pb	Pares de Bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween®</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>

ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SEA	<i>Soluble Egg Antigen</i>
SES-PE	Secretarias de Estado da Saúde do estado de Pernambuco
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL.....	18
2.1 Epidemiologia da esquistossomose.....	18
2.2 Ciclo evolutivo e transmissão.....	21
2.3 Manifestações clínicas.....	24
2.4 Tratamento.....	26
2.5 Diagnóstico.....	28
<i>2.5.1 Métodos de imagem.....</i>	<i>29</i>
<i>2.5.2 Métodos parasitológicos.....</i>	<i>30</i>
<i>2.5.3 Métodos moleculares.....</i>	<i>31</i>
<i>2.5.4 Métodos imunológicos.....</i>	<i>32</i>
2.6 Polipeptídeo Sm15.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 Geral.....	39
4.2 Específicos.....	39
5 METODOLOGIA	40
5.1 Desenho e população de estudo.....	40
5.2 Método de Coleta de Amostra de Material Biológico.....	40
5.3 Obtenção dos vermes e extração do DNA.....	40
5.4 Amplificação das seqüência de DNA – PCR convencional.....	41
5.5 Clonagens.....	42
5.6 Sequenciamento de DNA.....	42
5.7 Extração do inserto e subclonagem em plasmídeo de expressão.....	42
5.8 Expressão e purificação do polipeptídeo.....	43
5.9 Sequenciamento dos polipeptídeos Sm15 recombinantes.....	43
5.10 Reatividade do polipeptídeo Sm15 por ELISA <i>in house</i>.....	44
5.11 Análise estatística.....	44
5.12 Aspectos éticos.....	45
6 RESULTADOS.....	46
6.1 Amplificação e clonagem da seqüência codificante para o polipeptídeo Sm15.....	46

6.2 Seleção de clones positivos por PCR de colônia.....	48
6.3 Sequenciamento.....	48
6.4 Subclonagem em vetor de expressão proteica.....	50
6.5 Expressão e indução proteica.....	52
6.6 Purificação proteica.....	55
6.7 Sequenciamento das proteínas recombinantes obtidas.....	57
6.8 População de estudo.....	57
6.9 Padronização do ELISA.....	59
6.10 Resultados do ELISA e análise estatística.....	60
7 DISCUSSÃO.....	64
8 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES	
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	82
APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa.....	84
ANEXOS	
ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CPqAM/Fiocruz.....	86

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande impacto socioeconômico, causada pelo trematódeo digenético do gênero *Schistosoma*, sendo um grave problema de saúde pública em vários países. Classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a segunda parasitose humana mais prevalente, entre as doenças tropicais, perdendo apenas para a malária. Estima-se que 230 milhões de pessoas no mundo, principalmente na África, Ásia e Américas, estejam infectadas pelo *Schistosoma* e que 800 milhões de pessoas corram o risco de adquirir a infecção.

Existem duas fases clínicas da esquistossomose no homem: aguda e crônica. A aguda geralmente progride para um período assintomático e eventualmente para a fase crônica, caso não seja diagnosticada e tratada corretamente. A fase crônica pode ter três formas clínicas principais: hepática, hepatointestinal e hepatoesplênica.

O *Schistosoma mansoni*, se instala preferencialmente no sistema venoso mesentérico do homem e a patologia resultante da infecção pelo helminto está associada a uma reação granulomatosa crônica, que é causada quando os ovos, que são liberados pelo verme adulto, atingem os segmentos intra-hepáticos da veia porta. Estes ovos liberam vários compostos, sendo um deles o antígeno solúvel de ovo (SEA), proveniente dos miracídios, que são potentes e contínuos estimuladores da resposta imune. Essa intensa estimulação pode levar a fibrose periportal hepática e como consequência hipertensão portal, formando varizes esofágicas, que podem se romper e causar hemorragias digestivas graves, muitas vezes fatais.

O diagnóstico da infecção esquistossomótica consiste na demonstração da presença de ovos do *S. mansoni* em fezes ou tecidos, sendo sua visualização nas fezes considerada o padrão ouro, porém, resultados negativos em exames coprológicos não excluem a possibilidade de infecção, principalmente quando se trata de paciente com infecção leve ou em fase crônica e em áreas de baixa endemicidade onde a carga parasitária é muito pequena.

O ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) por captura utilizando anticorpos monoclonais foi um dos primeiros a ser usado para auxiliar no critério de cura, pois consegue detectar antígenos circulantes, caracterizando a doença ativa. Porém, esses testes não são utilizados rotineiramente no diagnóstico, uma vez que a aquisição dos anticorpos monoclonais encarece essa técnica. Segundo Carvalho (2011), o desenvolvimento de antígenos com potencial para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose pode ajudar a superar a limitação supracitada.

A primeira tentativa de desenvolver e padronizar ensaios diagnósticos que pudessem superar as limitações dos exames parasitológicos foi a utilização de testes baseados na determinação de anticorpos específicos realizada feita por Mott e Dixon (1982). Utilizando purificações proteicas como Antígeno Aniônico Circulante (AAC), o Antígeno Catiônico Circulante (ACC), a fração catiônica 6 do antígeno solúvel do ovo (CEF6), o antígeno sorológico maior (MSA1), antígenos microssomais do verme adulto (MAMA) e o antígeno associado intestino este estudo teve como objetivo desenvolver variações de ELISA mais específicos e que apresentassem menores taxas de reatividade cruzada. No entanto nos dias atuais mesmo com a utilização de novas preparações antigênicas, compostas por antígenos purificados e recombinantes, as técnicas de diagnóstico imunológico não estão padronizadas e ainda apresentam reações cruzadas com outros helmintos, protozoários. Estas reações tendem a gerar uma baixa especificidade, prejudicando desta maneira a confirmação absoluta da infecção.

Vários antígenos derivados do *S. mansoni* foram encontrados na circulação, porém, somente alguns foram bem estudados, com é o caso do Antígeno Aniônico Circulante (AAC), cuja sensibilidade num experimento através de ELISA apresentou a taxa mais baixa detectável do antígeno no soro relacionada a uma excreção de no mínimo 10 ovos por grama de fezes. Além disso, imunoensaios mostraram previamente que antígenos derivados do *Schistosoma* estavam presentes tanto na circulação, quanto na excreta de hospedeiros infectados, revelando assim o potencial do imunodiagnóstico para a esquistossomose.

Levando em conta os dados supracitados, é importante que haja alternativas no diagnóstico da esquistossomose mansônica e para isso outros alvos proteicos, necessitam ser identificados e padronizados para que novos métodos diagnósticos e imunoproláticos possam ser desenvolvidos. Nesse sentido, salientamos que Abath *et al.* (1993) isolaram de uma biblioteca de cDNA um clone que codifica um polipeptídeo de 15 Kda denominado Sm15. Por apresentar reatividade com soros de animais infectados com *S. mansoni*, o polipeptídeo Sm15 possui potencial para abordagens imunoproláticas e para o desenvolvimento de testes diagnósticos. Então, este trabalho tem por objetivo obter o polipeptídeo recombinante Sm15 em *Escherichia coli* e verificar o potencial do antígeno obtido para o desenvolvimento de métodos diagnósticos a partir de amostras sorológicas obtidas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da esquistossomose.

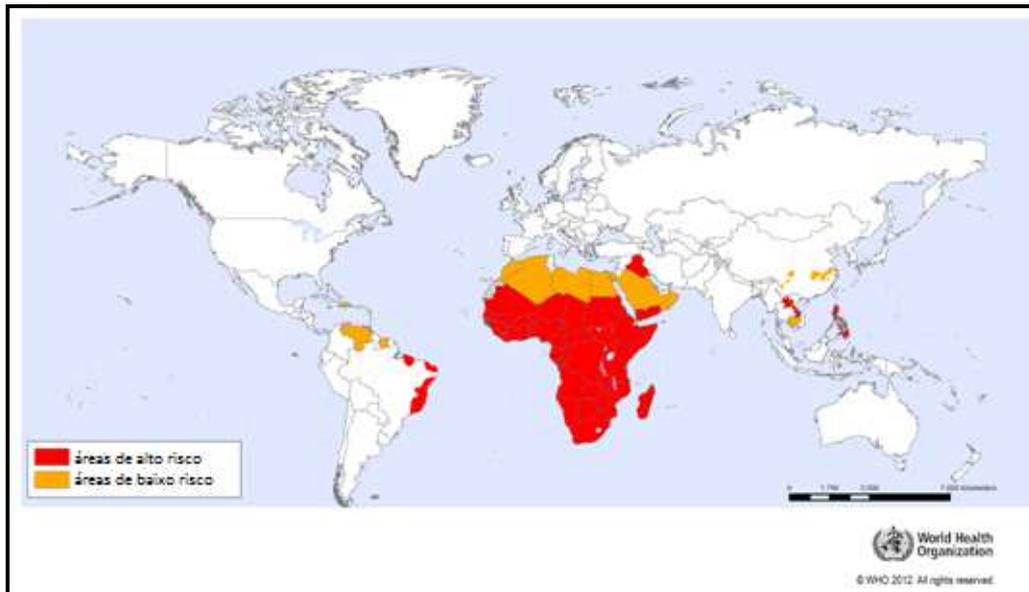
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Epidemiologia da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária que apresenta um enorme impacto socioeconômico, gerando assim graves problemas de saúde pública em inúmeros países ao redor do globo (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). A doença, que é causada pelo verme trematódeo digenético do gênero *Schistosoma*, foi descrita cientificamente pela primeira vez, em 1851, pelo médico alemão Theodor Maximilian Bilharz e em consequência a este fato além de **Xistose**, **Barriga D'água** e **Doença dos Caramujos**, o termo **Bilharzíase** também foi usado como um nome alternativo da doença. A esquistossomose, que é um dos principais problemas de saúde enfrentados por países subdesenvolvidos (CHITSULO *et al.*, 2000), também é apontada como a segunda morbidade mais prevalente dentre todas as doenças tropicais, ficando atrás apenas dos casos de malária (BICHLER, *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 201; OLLIARO *et al.*, 2011).

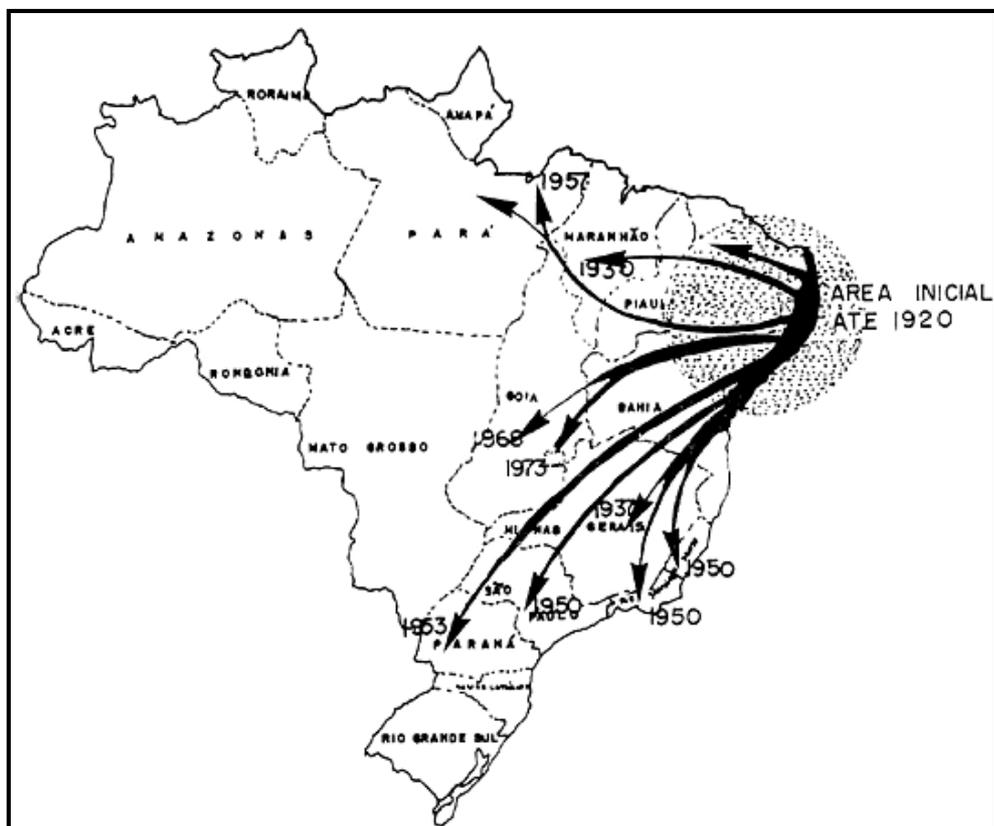
Atualmente, esta morbidade afeta diversas partes do mundo, incluindo o continente Africano (Angola, Camarões, Egito, Líbia, Nigéria entre outros), a região Caribenha (Porto Rico, República Dominicana), todo o Oriente Médio (Arábia Saudita, Iêmen, Irã, Iraque, Israel), e países como Filipinas, China, Malásia, Camboja, Laos e Brasil (**Figura 1**), sendo encontrada em mais de 77 países. A doença infecta aproximadamente 230 milhões de indivíduos (BRANDT *et al.*, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012), sendo 85% dos casos estimados localizados na região subsaariana do continente africano (VAN DER WERF *et al.*, 2003), trazendo o risco de infecção a outros 800 milhões de pessoas (STEINMANN *et al.*, 2006).

Das Américas, o Brasil é o país mais impactado pela esquistossomose (CHITSULO *et al.*, 2000; PORDEUS *et al.*, 2008), que surgiu neste país por meio de duas razões. A primeira foi através de imigrantes orientais que eram portadores do parasita e a segunda, e o principal motivo, foi devido ao tráfico de escravos africanos, como mostra o mapa (**Figura 2**). A única espécie que representa interesse médico e científico no Brasil é o *Schistosoma mansoni*, pois dentre vários fatores que contribuíram para que esta espécie se difundisse amplamente no território brasileiro o principal foi a presença do hospedeiro intermediário específico, planorbídeos do gênero *Biomphalaria* (**Figura 3A**), que são suscetíveis à infecção somente por platelmintos da espécie *S. mansoni*.

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial da Esquistossomose mansônica

Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2012.

Nota: Mapa mundial destacando a distribuição geográfica dos casos de esquistossomose mansônica, as áreas vermelhas representam áreas de maior risco de infecção, as zonas em amarelo representam áreas de baixo risco e as áreas em branco não apresentam risco de infecção.

Figura 2 - Expansão da transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil

Fonte: Machado (1988).

Nota: O mapa mostra a expansão da morbidade no Brasil dando ênfase a sua origem na região nordeste, devido ao tráfico negreiro. O mapa ainda mostra que a morbidade permaneceu estabilizada no seu foco inicial até meados de 1920, expandindo-se a partir daí para as demais áreas do país.

Figura 3 - Hospedeiros intermediários da Esquistossomose

Fonte: Schistosomiasis. New York, 2012. Disponível em <http://www.infectionlandscapes.org/2012/06/schistosomiasis.html>. acesso em 20 Jan 2014.

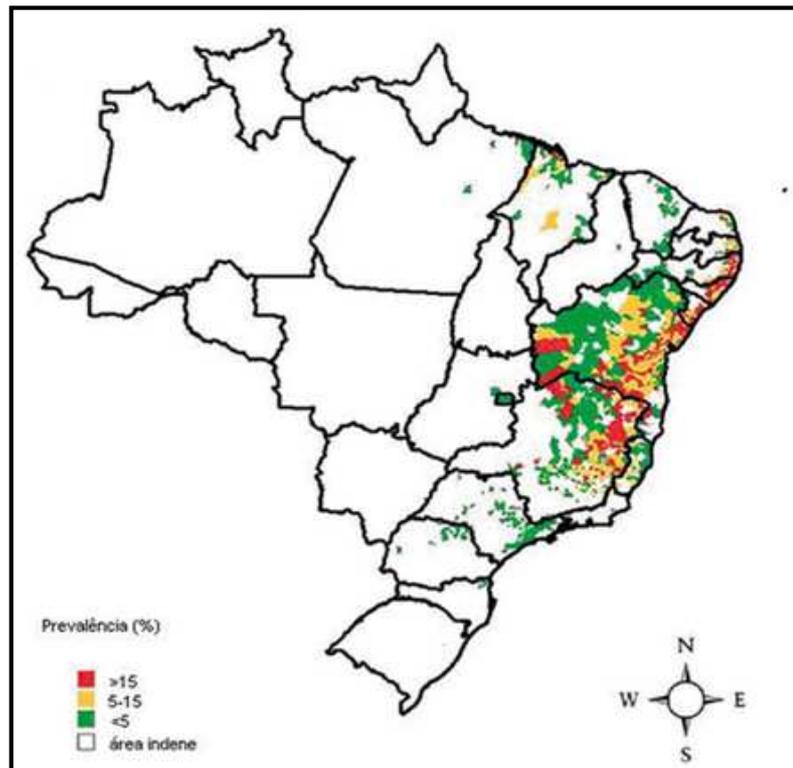
Nota: Hospedeiros intermediários da esquistossomose, sendo A-caramujo do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro de principal importância para o Brasil, pois é o hospedeiro intermediário do *S. mansoni* causador da esquistossomose mansônica. B-caramujo do gênero *Bulinus*, hospedeiro do *S. haematobium* C-caramujo do gênero *Oncomelania*, hospedeiro intermediário do *S. japonicum*.

Segundo Neves et al. (2006) a existência de grandes coleções hídricas, a presença de condições de temperatura e luminosidade bem como o clima tropical similar ao da região autócone da morbidade, o aumento populacional nas áreas de risco, a ausência de uma mínima infraestrutura sanitária necessária em áreas endêmicas e deficiências na implementação de políticas de controle da doença e educação da população são os principais fatores que contribuem na expansão e manutenção da morbidade no país (CHITSULO *et al.*, 2000). No Brasil, a esquistossomose está presente em 19 unidades federativas (GAZZINELLI *et al.*, 2002), sendo considerados como área endêmica uma faixa litorânea que compreende todos os estados do Maranhão até o Espírito Santo, apresentando focos endêmicos isolados no Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010) (**Figura 4**). Embora o Ministério da Saúde estime que o número de casos de esquistossomose mansônica no Brasil seja de 2,5 milhões, outros estudos apontam a existência de um número bem mais elevado, que gira em torno de 6 -7 milhões, sendo a maioria destes casos localizados na região Nordeste (BRASIL 2010; DE SOUZA *et al.*, 2012; NETO *et al.*, 2013; VITORINO *et al.*, 2012).

O Nordeste, além de ser a região brasileira com a maior mortalidade do país devido à esquistossomose é a região que apresenta o maior número de indivíduos infectados (FERREIRA; SILVA, 2007). Nesta região localiza-se uma faixa endêmica caracterizada por uma zona litorânea contínua que compreende os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe, (BINA; PRATA, 2003; BRASIL, 2009; KATZ; PEIXOTO, 2000; LENGELER *et al.*, 2002). Além disso, o aumento da esquistossomose urbana nessa região expõe a constante ameaça que a doença representa não só para a saúde pública brasileira, mas também para todos os países em desenvolvimento.

Em Pernambuco, as zonas endêmicas compreendem 102 dos 186 municípios do estado (DOMINGUES; SILVA, 2011) totalizando aproximadamente 18 mil indivíduos atingidos pela morbidade, ocupando assim, o 3º lugar em prevalência da região Nordeste (COURA; AMARAL, 2004). Este estado foi responsável por aproximadamente 40% dos casos de óbito atribuídos à esquistossomose no ano de 2006 (PERNAMBUCO, 2008). Além disso, novas áreas de transmissão têm sido encontradas evidenciando uma mudança no perfil epidemiológico da doença, como é o exemplo de zonas praianas próximas a Região Metropolitana do Recife (Porto de Galinhas), mostrando que a morbidade está em franca expansão. Na região costeira pernambucana a maior parte dos casos se manifesta na forma aguda da doença afetando indivíduos e turistas que nunca foram expostos ao parasito, enquanto em áreas rurais, a doença continua a afetar a população de baixa renda, manifestando-se predominantemente na sua forma crônica (GOMES et al., 2014; PEREIRA et al., 2010).

Figura 4 - Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil



Fonte: Amaral, Taiui, e Engels, (2006).

Nota: Evidenciando as zonas e suas prevalências em percentual, apresentando as áreas vermelhas, amarelas, verdes e brancas um percentual de 15, entre 5 e 15, menor que 5 e nenhum caso (indene) respectivamente.

2.2 Ciclo evolutivo e transmissão

O *S. mansoni* (**Figura 5**) possui um ciclo de vida complexo que requer no mínimo um caramujo de água doce, uma coleção hídrica parada ou com pouca correnteza (até 29 cm/s) e

um hospedeiro definitivo. O trematódeo digenético pertencente à família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma* é um platelminto que apresenta um nítido dimorfismo sexual e contém vários estágios de desenvolvimento sendo capaz de parasitar não só homens, mas, diversos animais como primatas, marsupiais (gambá), ruminantes, roedores e lagomorfos (lebres e coelhos), que são considerados hospedeiros permissivos ou reservatórios (NEVES, 2006; SOUZA, *et al.*, 2011).

Os caramujos pertencentes à família *Planorbidae*, gêneros *Biomphalaria*, *Oncomelania* e *Bulinus* são os organismos que possibilitam a reprodução assexuada das principais espécies contaminantes de seres humanos o *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* respectivamente (JORDAN *et al.*, 1969; DIAS *et al.*, 1994; OLIVEIRA; SANTOS, 2002; MOURA *et al.*, 2005), essas espécies de platelmintos apresentam muitas diferenças, que variam desde à penetração larval e diferentes reações imunológicas induzidas nos hospedeiros até aspectos morfológicos do verme e suas variadas formas de vida, (WARREN, 1975). Devido à inexistência de planorbídeos dos gêneros *Bulinus* (**Figura 3B**) e *Oncomelania* (**Figura 3C**), que são suscetíveis as outras espécies do gênero *Schistosoma*, o *S. mansoni* é a única que representa interesse médico e científico para o Brasil (SOUZA, *et al.*, 2011), esta espécie de platelminto apesar de não apresentar nenhum vetor possui ciclo de vida complexo, apresentando duas fases de reprodução uma assexuada no hospedeiro intermediário (Planorbídeo) e uma fase sexuada em um hospedeiro definitivo (Homem) (UTZINGER *et al.*, 2001; BRASIL, 2012).

O ciclo evolutivo da esquistossomose (**Figura 6**) se inicia quando o homem é infectado pelas cercárias, que se fixam entre os folículos pilosos e penetram ativamente em sua pele ou de sua mucosa (SOUZA, *et al.*, 2011). Após a infecção as cercárias se desenvolvem para a forma parasitária, conhecida como esquistossômulo, que iniciará o processo migratório pelas vias linfática e sanguínea. Ao atingir o fígado (sistema porta intra-hepático) os esquistossômulos irão evoluir para as diferentes formas adultas (1 – 2 meses pós infecção) que migrarão para o local onde os machos e as fêmeas se acoplam e copulam, as veias mesentéricas do sistema vascular do hospedeiro vertebrado. Então o casal migra contra a corrente sanguínea até atingir a submucosa de vasos menos calibrosos da parede intestinal, onde serão capazes de realizar a ovoposição (BRASIL, 2012).

Figura 5 - Formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*

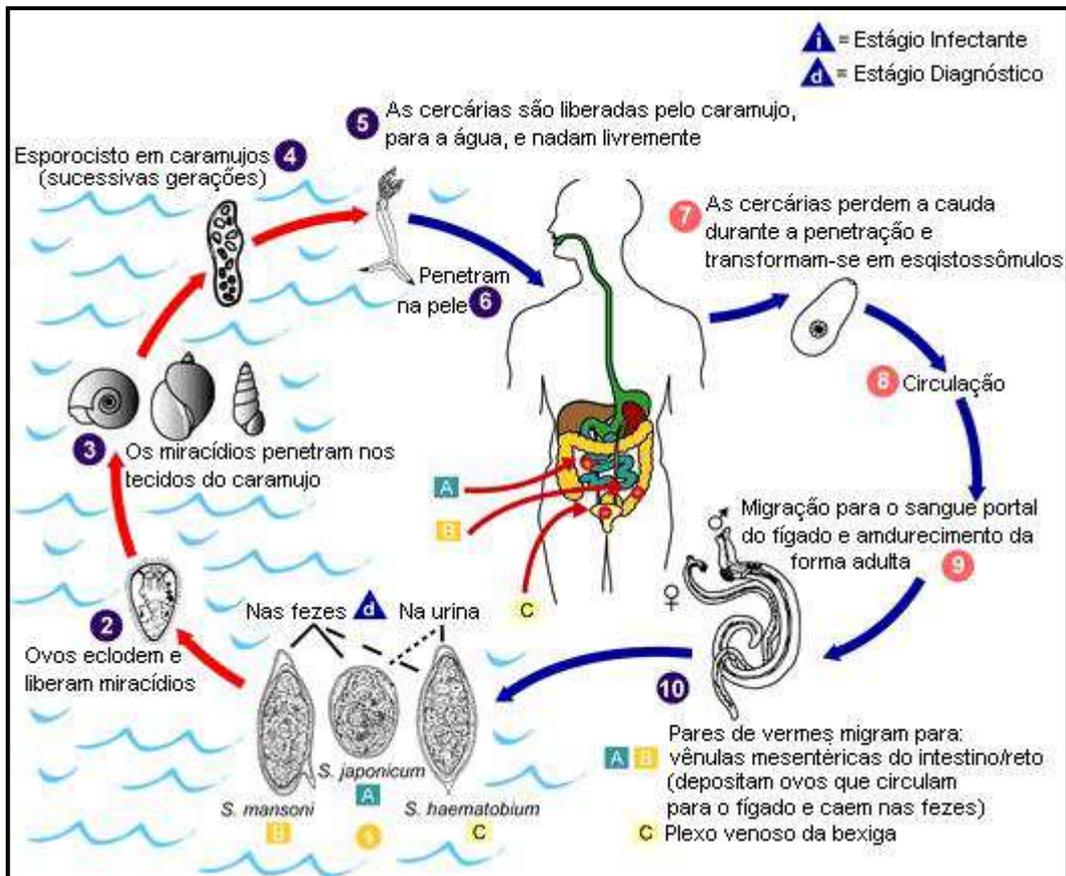
Fonte: Schistosomiasis. New York, 2012. Disponível em <http://www.infectionlandscapes.org/2012/06/schistosomiasis.html>, acesso em 20 Jan 2014.

Nota: A figura mostra os diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*, sendo A-Ovo, com seu espículo característico; B-Cercária, forma infectante do hospedeiro definitivo; C-Miracídio, forma infectante do hospedeiro intermediário; D-Verme macho adulto, com a presença do canal ginecóforo; E-Verme fêmea adulto; F-Casal acasalado, pronto para a fecundação.

O homem infectado pode eliminar ovos viáveis de *S. mansoni* a partir da quinta semana após a infecção, esta eliminação de ovo pela excreta geralmente dura um período de seis a 10 anos, podendo chegar à de 20 anos. (BRASIL, 1998; 2012).

Os ovos levam cerca de uma semana para atingir a maturidade e contém o miracídio formado em seu interior, as fêmeas da espécie *S. mansoni* põem de 500 - 1000 ovos/dia (LIMA, 2002), porém, no geral somente 20% são excretados pelo hospedeiro para o meio externo, onde permanecem viáveis por 7 dias (LIMA, 2002; NEVES, 2006; SOUZA, *et al.*, 2011).

Ao entrar em contato com uma coleção hídrica, os ovos eclodem e liberam larvas ciliadas denominadas miracídios, que estimulados principalmente pela quimiotaxia ao hospedeiro intermediário, nadam ativamente e penetram nos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*. Após infectar o hospedeiro intermediário, os miracídios iniciarão um processo de alterações morfológicas, onde perderão seus cílios e transformando-se em esporocistos primários, que se multiplicarão de forma exponencial através da poliembrionia e originarão os esporocistos secundários. Estes esporocistos por sua vez irão migrar para as glândulas digestivas do hospedeiro e se diferenciar em cercárias. Os hospedeiros intermediários começam a eliminar cercárias de quatro à sete após semanas a infecção pelos miracídios e os mesmos eliminaram cercárias por toda a vida, que dura aproximadamente 1 ano (BRASIL, 1998; 2012). Ao serem liberadas, numa coleção hídrica, as cercárias nadarão livremente até infectar novamente o hospedeiro definitivo, completando assim o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

Figura 6 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

Fonte: Saúde. São Paulo, 2012. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN_Esquistoso>. acesso em 20 Jan 2014.

Nota: A figura mostra todo o ciclo de vida dos trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, a fase de reprodução assexuada (moluscos, hospedeiro intermediário) e a fase de reprodução sexuada, no homem (hospedeiro definitivo). 1 – Após excretados, os ovos do *Schistosoma mansoni* eclodem ao entrar em contato com uma coleção hídrica; 2 – O miracídio, larva ciliada liberada pela eclosão do ovo é estimulado por quimiotaxia a infectar seu hospedeiro intermediário; 3 – O miracídio ao infectar o molusco de gênero *Biomphalaria* se diferencia em esporocisto; 4 – O esporocisto através de poliembrião e sucessivas gerações originará várias cercárias; 5 – As cercárias eliminadas pelo caramujo irá nadar ativamente até encontrar um hospedeiro definitivo (Homem); 6 e 7 – Ao penetrar através da pele a cercária se diferenciará em esquistossômulo; 8 e 9 – Após migrar através da corrente sanguínea e chegar ao fígado, o esquistossômulo irá amadurecer para forma adulta do verme; 10 – Depois de se acoplarem, macho e fêmea juntos migram para as veias mesentéricas, onde irão acasalar e iniciar o processo de liberação dos ovos, que após percorrerem o fígado e caírem nas fezes, serão excretados pelo homem reiniciando o ciclo.

2.3 Manifestações clínicas

A evolução clínica da esquistossomose tem caráter crônico-evolutivo e apresenta gravidade variável, podendo permanecer numa fase aguda ou, caso não seja diagnosticada e tratada corretamente, poderá evoluir para a fase crônica (KATZ; ALMEIDA, 2003). A gravidade das formas clínicas depende de uma série de fatores do hospedeiro e do parasito, como resposta imunológica específica do hospedeiro definitivo, virulência das cepas que o infectaram, a taxa de ovoposição do verme, carga parasitária, perfil genético de ambos (agente etiológico e hospedeiro), idade e estado clínico-nutricional do indivíduo infectado, localização

do parasito no hospedeiro e número de reinfecções (REY, 1991; TANABRE *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2007; NEVES, 2006; BRASIL, 2010; MELO; COELHO, 2010).

A fase inicial ou aguda da doença pode ser subdividida em duas formas, assintomática e sintomática (BRASIL, 2010). A forma aguda assintomática geralmente ocorre no primeiro contato do indivíduo com o estágio larval da cercária ainda na infância, algumas vezes é diagnosticada por alterações encontradas em exames de rotina como eosinofilia e presença de ovos no exame coprológico, apesar de passar despercebida na grande maioria dos pacientes (NEVES *et al.*, 2006; BURKE *et al.*, 2009; BRASIL, 2010).

A forma aguda sintomática apresenta até 5º dia pós-infecção micropápulas prurino-eritematosas, semelhantes a eczemas de contato, que são lesões características da dermatite cercária originadas pela penetração deste estágio larval, geralmente estas lesões ocorrem em indivíduos que nunca entraram em contato com o verme (BRASIL, 2012). Além disso, no período de 3 - 7 semanas após a infecção alguns indivíduos podem desenvolver a febre de Katayama, que é caracterizada por alterações como leve hepatoesplenomegalia, febre, cefaleia, linfadenopatia, dores abdominais, anorexia e raramente podem ocasionar diarreia, tosse seca e náuseas com ou sem a presença de vômito (PORDEUS *et al.*, 2008; BURKE *et al.*, 2009; BRASIL, 2010), nesta forma a doença continua sendo percebida, basicamente pela eosinofilia, que se apresentará muito elevada.

A fase aguda da esquistossomose, em geral dura 2 meses, e regride espontaneamente ou através de tratamento quimioterápico específico (BRASIL, 2010). A fase tardia ou crônica da morbidade só inicia no 6º meses após a infecção e pode durar vários anos (10 - 20), com sinais da sua progressão sendo identificados em vários órgãos como fígado, baço, pulmões podendo levar a hipertensão portal e pulmonar, com ruptura das varizes esofágicas e ascite nos casos mais graves (BRASIL, 2010).

A fase crônica pode ser dividida quanto a sua gravidade em duas formas, leve e grave, as quais podem ainda ser subdivididas em 5 formas clínicas, assintomática, hepatointestinal e hepática (Leves) e hepatoesplênica compensada e descompensada (Graves) (PORDEUS *et al.*, 2008; BRASIL, 2012). As manifestações clínicas das formas crônicas da esquistossomose variam de acordo com a idade em que ocorreu a primeira exposição, a frequência de infecções, estado imunológico do indivíduo e presença, ou não, de quimioterapia específica (KATZ; ALMEIDA, 2003; BRASIL, 2009)

A esquistossomose hepatointestinal (EHI) é responsável por 90% dos casos da morbidade, sendo a forma mais encontrada nas áreas endêmicas (PORDEUS *et al.*, 2008) sendo caracterizada por intensa dor estomacal (epistralgia), diarreias, por vezes sanguinolentas, vômitos

e fígado palpável com nodulações. Estas nodulações poderão evoluir para fibrose avançada (fibrose de Symmers), ou seja, áreas de fibrose geradas por granulomatose periportal (BRASIL, 2010; SOUZA *et al.*, 2011). Na EHI a dosagem sérica da γ -glutamil transferase (GGT) e da fosfatase alcalina encontram-se bem elevadas, sendo assim, testes para detecção destas enzimas hepáticas podem ajudar no diagnóstico da doença (MATTOS; DANTAS-CORREA *et al.*, 2010).

A forma hepática da esquistossomose mansônica (EH), é uma forma transitória entre a esquistossomose de menor gravidade e a forma grave, por esta razão a mesma apresenta um espectro muito grande de variações clínicas indo desde a forma assintomática, passando pela fase de fígado palpável, característica da EHI e apresentando na ultrassonografia, a presença de fibrose hepática periportal (FPP) moderada ou intensa, sintomas característicos da esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (NEVES, *et al.*, 2006; BRASIL, 2010; MATTOS; DANTAS-CORREA *et al.*, 2010).

A EHE representa de 4% a 12% da morbidade da doença nos áreas endêmicas (DOMINGUES, 2008), ela apresenta uma subdivisão nas formas compensada e descompensada. Apesar de ambas apresentarem FPP intensa com presença de esplenomegalia causando hipertensão portal, surgimento de varizes esofágicas, dores abdominais atípicas, sensação de peso e funções intestinais alteradas, somente, a forma descompensada apresenta uma drástica diminuição da função hepática que pode ser notada através da intensa hemorragia, apresentando ou não melena, hematêmese e ascite (NEVES, 2006; BRASIL, 2010; SOUZA *et al.*, 2011).

A esquistossomose, ainda pode se apresentar em formas raras como a vasculopulmonar, a hipertensão pulmonar, a glomerulopatia (estágios muito avançados da doença) e em formas ectópicas que se caracteriza pela presença de granulomas esquistossomóticos em outras localizações como nos órgãos genitais, na retina, na pele, coração, tireoide e sistema nervoso central, sendo a neuroesquistossomose ou neurorradiculite esquistossomótica a mais grave dessas formas (BRASIL, 2010; MATTOS; DANTAS-CORREA *et al.*, 2010).

2.4 Tratamento

O tratamento da esquistossomose é realizado através de drogas antiparasitárias que possuem em suas fórmulas substâncias químicas tóxicas ao parasito. Porém o tratamento desta morbidade sempre foi limitado pela falta de quimioterápicos de alta eficácia e reações adversas toleráveis (NOVAES *et al.*, 1999). Muitas drogas utilizadas no tratamento inicial da

esquistossomose tiveram sua utilização descontinuada, por apresentarem uma enorme gama de efeitos colaterais e alta toxicidade, como exemplo, os derivados antimoniais (tartarato de potássio e antimônio, tártaro emético e o estibofeno), a lucantona, a hicantona e o fármaco 1-niridazol (NOVAES *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Atualmente, o governo brasileiro dispõe de dois medicamentos para tratar os indivíduos portadores de *S. mansoni*, o praziquantel e a oxaminiquina, ambos quimioterápicos são bem tolerados, possuem baixa toxicidade e suas eficácias são equivalentes, girando em torno de 70 à 80% (BRASIL, 2010). No Brasil a droga de escolha é o praziquantel, pois, a oximiniquina só atua nas formas adultas do *S. mansoni*, a mesma possui efeitos colaterais no sistema nervoso central além dos efeitos carcinogênicos (ARAÚJO *et al.*, 2008). O praziquantel, por possuir produção nacional, fabricado em Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz o mesmo apresenta menor custo/tratamento (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O praziquantel é um fármaco de administração oral, sendo utilizados em dose única de 50mg/Kg de peso para adultos e 60mg/Kg de peso para crianças (BRASIL, 2005b ; KATZ; ALMEIDA, 2003; MATOS *et al.*, 2007). Uma substância quimioterápica isoquinolino-pirazinica compõe a fórmula do praziquantel, é específica ao gênero *Schistosoma*, o que dificulta possíveis reações cruzadas. Os efeitos colaterais deste fármaco são dor abdominal, cefaleia e sonolência, bem menos preocupantes quando comparados aos da oxaminiquina. Além disso, não existem evidências de desencadeamento de lesões hepáticas ou em qualquer outro órgão (NEVES, 2006; BRASIL, 2010).

A oxaminiquina, também possui via de administração oral, são recomendadas as doses de 15 mg/kg em adultos e de 20 mg/kg em crianças, sendo administradas de um única vez, 1 hora após a refeição (NEVES, 2006; BRASIL 2010; MELO; COELHO, 2010). A substância quimioterápica utilizada neste fármaco é do grupo químico aminoalquitolueno, que através de efeitos anticolinérgicos inibe a síntese de ácidos nucleicos. Além dos efeitos carcinogênicos, acima citados, a oxaminiquina também promove alterações significativas no sistema nervoso central, como distúrbios comportamentais, tontura e alucinações entre outros (NEVES, 2006; BRASIL 2010).

A distribuição dos medicamentos é gratuita e repassada para as Secretarias de Estado da Saúde (SES), pela Secretaria de Vigilância em Saúde, ficando disponível na rede de Atenção Básica a Saúde dos municípios ou nas unidades de referência para tratamento da esquistossomose e todos os pacientes com casos confirmados devem realizar tratamento quimioterápico (BRASIL, 2010).

2.5 Diagnóstico

Os sinais e sintomas característicos da esquistossomose podem sugerir o seu diagnóstico clínico, juntamente com os dados epidemiológicos do paciente, como exemplo a procedência de áreas endêmicas, histórico de contato com coleções hídricas contaminadas e existência de casos na família. Porém, existe a necessidade de confirmação através de exames laboratoriais, já que a esquistossomose pode ser confundida com outras doenças (**Figura 7**) em função das diferentes manifestações que ocorrem durante a sua evolução (BRASIL, 2010).

Figura 7 - Diagnóstico diferencial da esquistossomose mansônica em suas díspares fases evolutivas

<p>Dermatite Cercariana</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndromes exantemáticas (sarampo, rubéola; escarlatina); • Dermatites causadas por cercárias de outros esquistossomos não patogênicos ao homem; • Dermatites causadas por larvas de outros helmintos; • Dermatite causada por substâncias químicas.
<p>Esquistossomose Aguda (febre de Takayama)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malária; • Febre tifoide; • Hepatite viral anictérica (A e B); • Estrongiloidíase; • Amebíase; • Mononucleose; • Tuberculose miliar; • Ancilostomose aguda; • Brucelose; • Doença de Chagas aguda.
<p>Esquistossomose Crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Amebíase; • Estrongiloidíase; • Giardíase; • Outras parasitoses; • Linfoma; • Afecções que cursam com o aumento volumétrico do fígado e do baço (hepatoma, calazar, leucemia, salmonelose prolongada, esplenomegalia tropical, e cirrose).

Fonte: Vitorino *et al.*, (2012).

Nota: O quadro mostra todas as doenças que possuem a sintomatologia clínica semelhante a morbidade em questão, dividindo as diversas doenças que cursam com o diagnóstico diferencial da esquistossomose por fases da mesma.

Até o final dos anos 80 o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* só era alcançado através da demonstração direta do parasita, em uma de suas formas evolutivas, nos tecidos ou excreções do hospedeiro (RABELLO, 1997). Como resultado aos esforços e avanços

tecnológicos das últimas décadas, algumas alternativas para o diagnóstico da esquistossomose foram desenvolvidas e os métodos laboratoriais utilizados atualmente podem ser classificados em dois tipos, métodos indiretos e diretos (Tabela 1).

Os métodos indiretos baseiam-se em marcadores bioquímicos, imunológicos ou de imagem, cujas alterações morfológicas possam estar associadas à infecção pelo *S. mansoni*; já os métodos diretos fundamentam-se na detecção do parasito, de seus ovos, DNA, substâncias antigênicas ou de fragmentos celulares e são subclassificados em métodos parasitológicos, moleculares ou imunológicos (BRASIL, 2010).

Quadro 1 – Classificação dos tipos de métodos utilizados para diagnóstico da esquistossomose.

Métodos de diagnóstico	
Diretos	Indiretos
<ul style="list-style-type: none"> • Parasitológicos (Kato-Katz) • Imunológicos (pesquisa de antígenos) • Moleculares (PCR, LAMP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Epidemiologia (dados clínicos do paciente) • Imunológicos (pesquisa de anticorpos) • Métodos de imagem (ultrassonografia)

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.5.1 Métodos de imagem

Dentre os métodos de imagem, podemos destacar a ultrassonografia (US) como método mais utilizado por ser um método seguro, rápido, não invasivo, simples de ser realizado, por permitir a avaliação da extensão e evolução da doença, a avaliação do grau de fibrose periportal (FPP), além de auxiliar na classificação das fases da doença, possuir um baixo custo, não apresentar desvantagens como a irradiação e por possuir simples aplicabilidade em estudos de campo quando comparado a outros métodos de imagem (DOMINGUES, 2008).

A OMS classifica os graus de fibrose de duas maneiras, uma graduação subjetiva e outra objetiva. Na subjetiva ocorre uma análise comparativa do fígado examinado com determinados padrões de comprometimento pela fibrose periportal (BURKE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2007), estes padrões são obtidos pela classificação de Niamey (RICHTER *et al.*, 2001), a qual considera seis padrões de fibrose periportal sendo: A (ausência de fibrose); B (duvidosa); C (periférica); D (central); E (avançada) e F (muito avançada) (SANTOS *et al.*, 2007). Na objetiva, o que ocorre é uma análise quantitativa na qual se mede a espessura da fibrose periportal. O espessamento fibroso periportal constitui alterações que permitem uma identificação da doença, sendo caracterizado na US como área de hiperecogenicidade periportal (BURKE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2007). Apesar da ampla utilização da US no acompanhamento e classificação das formas clínicas da esquistossomose, esse método de

avaliação não pode ser utilizado no diagnóstico pois as alterações patognomônicas da FPP só surgem em caso mais avançados da doença, além disso, para a realização do método ainda existe necessidade de um examinador treinado (FATAAR *et al.*, 1984; PINTO-SILVA *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 2001).

2.5.2 *Métodos parasitológicos*

As contribuições científicas do diagnóstico parasitológico da esquistossomose dos últimos 50 anos, no geral, não resultaram no desenvolvimento de novos métodos. Porém, têm contribuído bastante para uma melhora na compreensão das vantagens, limitações e da utilidade dos métodos disponíveis atualmente. Os métodos parasitológicos baseiam-se na detecção de ovos do parasito nas fezes ou nos tecidos do paciente, dentre estes métodos podemos destacar o esfregaço fecal Kato-Katz o qual tem sido amplamente estudado (ENGELS *et al.*, 1997; KONGS *et al.*, 2001; UTZINGER *et al.*, 2001; BERHE *et al.*, 2004; ENK *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008).

Tendo sua utilidade no controle da morbidade bem estabelecida, este método é considerado o padrão-ouro na esquistossomose mansônica sendo o método mais utilizado pelos programas de controle (GOMES *et al.*, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização desta técnica nos inquéritos epidemiológicos por ser um exame simples, rápido, de fácil execução, independente de grande infraestrutura laboratorial e por apresentar um baixo custo, aproximadamente U\$ 2 por teste. Além disto, este teste é preciso quantitativamente, permitindo, a avaliação da eficácia do tratamento e a avaliação da intensidade de parasitismo pela contagem de ovos em quantidade padronizada de fezes expressa por ovos por grama de fezes (opg) (ALMEIDA, 2003; KATZ *et al.*, 1972; KATZ & GONÇALVES *et al.*, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1985; SOUZA *et al.*, 2007).

Entretanto, resultados negativos em exames coprológicos não excluem a possibilidade de infecção, principalmente nos casos de pacientes com infecção leve ou em fase crônica e em áreas de baixa endemicidade onde a carga parasitária é muito pequena. Sendo assim, a prevalência da doença é subestimada nestes locais, tendo em vista a baixa sensibilidade desse método para detectar casos com pequeno número de ovos (DEVLAS; GRYSSELS, 1992; DOENHOFF *et al.*, 2004; NOYA *et al.*, 1999; RABELLO, 1997). Um aumento considerável da sensibilidade desta técnica pode ser obtido através do aumento no número de lâminas examinadas e/ou do tamanho da amostra, tornando a técnica mais eficaz nestes casos.

Contudo, esta abordagem limitaria as vantagens operacionais deste método em trabalhos de campo de grande escala (DEVLAS; GRYSSELS, 1992).

A biópsia retal ou hepática são métodos auxiliares indicados em casos de exame parasitológico de fezes negativo ou em condições muito especiais, porém a biópsia hepática, para o diagnóstico exclusivo da esquistossomose, não é recomendada, sendo utilizada apenas em casos de diagnóstico diferencial ou quando há necessidade de conhecimento da histologia do fígado, visto tratar-se de um procedimento invasivo (MELO; COELHO, 2010; NEVES, 2006; BRASIL 2010). O desenvolvimento de outras técnicas coproscópicas baseadas em sedimentação, centrifugação, flutuação e eclosão do miracídio, podem constituir uma alternativa a técnica de Kato Katz (GOMES *et al.*, 2014).

2.5.3 *Métodos moleculares*

Na última década os métodos moleculares de diagnóstico para esquistossomose têm sido bastante estudados, com o desenvolvimento de inúmeras técnicas baseadas na detecção e amplificação do DNA genômico do *S. mansoni*. (PONTES *et al.*, 2002, 2003; RABELLO *et al.*, 2002; SANDOVAL *et al.*, 2006).

Dentre os métodos moleculares disponíveis, a reação em cadeia polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada, possuindo muitas variações como LAMP (*Loop mediated isothermal AMPLification*), PCR (*Polimerase Chain Reation*) convencional, PCR-ELISA, Nested-PCR, qPCR (*Real Time Polimerase Chain Reation*) e RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reation*) (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Através do desenvolvimento de diversificados estudos a PCR vem se tornando cada vez mais um método alternativo para o diagnóstico da esquistossomose, como já foi mostrado, está técnica pode utilizar na amplificação do DNA uma gama variada de amostras como: fezes (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2012); soro (TEN HOVE *et al.*, 2008; HAGGAG; ABDULLAH, 2011); urina (SANDOVAL *et al.*, 2006; ENK *et al.*, 2012 apud CARNEIRO *et al.*, 2013) e plasma sanguíneo (CARNEIRO *et al.*, 2013). Além disso, estudos têm mostrado que através da PCR, é possível detectar infecções parasitárias precocemente quando comparados com outros métodos de diagnóstico, chegando a detectar o *Schistosoma spp.* no primeiro dia pós-infecção (KATO-HAYASHI *et al.*, 2010; SULBARAN *et al.*, 2010; GENTILE *et al.*, 2011).

Estudos também têm revelado que valores de sensibilidade e especificidade das técnicas de PCR, no geral, são satisfatórias, como demonstrado no estudo de Pontes *et al.* (2003), onde a técnica de PCR demonstrou uma sensibilidade de 96,7% e uma especificidade

de 88% quando aplicada em uma área endêmica do estado de Minas Gerais, tornando esta técnica 10 vezes mais sensível do que o esfregaço de Kato-Katz (PONTES *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar dos resultados observados nos estudos acima mencionados, a PCR para diagnóstico da esquistossomose, ainda não se encontra padronizada e seus valores de sensibilidade e especificidade são aquém do esperado para um método molecular (ENK, M. J. *et al.*, 2012). Além disso, há a necessidade de uma infraestrutura laboratorial mais complexa com custo mais elevado e de profissionais capacitados para implementação e realização desta técnica, dificultando sua utilização em pequenos centros de saúde nas áreas endêmicas.

2.5.4 Métodos imunológicos

Métodos imunológicos de diagnóstico caracterizam-se pela detecção de antígenos do parasito ou pela detecção de anticorpos gerados através da resposta imunológica dos hospedeiros humanos contra estes antígenos (BRASIL, 2010). Visando a promoção de alternativas para o diagnóstico da esquistossomose, desde a década de 80 vários grupos de pesquisa esforçam-se na tentativa de desenvolver métodos de imunodiagnóstico que apresentem altas taxas de sensibilidade e especificidade (CARVALHO, G. B. F. *et al.* 2011; DOENHOFF, 1982; GOMES *et al.*, 2014; MOTT; DIXON, 1982; RABELLO, 1997; SMITHERS; MONTENEGRO, 1992; WU, 2002).

Apesar do alto número de técnicas desenvolvidas, poucas têm alcançado as etapas de desenvolvimento e validação de teste em larga escala (GOMES *et al.*, 2014), tendo nenhum dos métodos preenchido todos os requisitos para uma "técnica ideal" como ser rápido, de baixo custo, depender de pouca infraestrutura, ser de fácil realização no campo, usar reagente único e apresentar altos valores de sensibilidade e especificidade (RABELLO, 1997). Dentre as técnicas desenvolvidas, as mais utilizadas são o teste de imunofluorescência indireta (IFI), teste de hemaglutinação indireta (HAI), teste de reação intradérmica e ELISA (NEVES, 2006; GOMES *et al.*, 2014).

Apesar do teste de reação intradérmica permanecer positivo por muitos anos após a realização de tratamento quimioterápico eficaz, este, é um modelo de teste desenvolvido para o reconhecimento imediato de antígenos do verme adulto do gênero *Schistosoma* e foi amplamente utilizado em investigações e inquéritos epidemiológicos na China e Porto Rico (GOMES *et al.*, 2014).

Através de seções do *Schistosoma* adulto em IFI foi demonstrado que a fluorescência associada ao intestino pode ocorrer no 44º dia pós-infecção, estando associada com infecção

esquistossomótica aguda. Este teste tem sido aplicado desde 1998 como ferramenta diagnóstica em inquéritos epidemiológicos de áreas de baixa endemicidade no Brasil. Em estudo comparativo realizado entre a IFI e o padrão ouro, demonstrou-se que a taxa de prevalência de uma população se elevava de 1,6% através do Kato-Katz, para 33,2% e 33,5% quando a triagem era realizada pelos métodos de IgG-IFI e IgM-IFI respectivamente (KANAMURA *et al.*, 1979; GOMES *et al.*, 2014).

A aglutinação de hemácias liofilizadas revestidas com SEA é o princípio básico para a detecção de soros com anticorpos para a esquistossomose, realizada através da técnica HAI, um teste simples, que requer pouca infraestrutura e possui fácil realização em campo. Além destas vantagens esta técnica apresentou em estudos níveis de sensibilidade que giram em torno de 85%, porém sua aplicabilidade em estudos de grande escala é limitada por sua baixa especificidade, pelo tipo de eritrócito e antígeno, pela persistência de reações positivas após tratamento eficaz e pela variação de sua sensibilidade frente a taxas de prevalências diferentes. Devido a estas desvantagens esta técnica só pode ser recomendada como um método auxiliar para o controle da doença (SORGHO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2014).

Além de ser o teste mais utilizado para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, o ELISA também é o teste mais versátil permitindo a utilização de diferentes antígenos e a detecção de diferentes classes de anticorpos (IgA, IgM e IgG). A detecção de anticorpos utilizando antígenos derivados do *S. mansoni* inicialmente era feita com extratos brutos do verme como o antígeno solúvel do ovo (SEA) e as proteínas solúveis de vermes adultos (SWAP). Porém, a baixa especificidade revelada por estudo iniciais com estes preparados antigênicos desencadeou o desenvolvimento de estudos para obtenção de novas preparações antigênicas e antígenos purificados, como a fração catiônica 6 (CEF6), o antígeno sorológico maior (MSA1), antígenos microssomais do verme adulto (MAMA) e o antígeno associado intestino, com a finalidade de desenvolver variações de ELISA mais específicos e que apresentassem menores taxas de reatividade cruzada (MOTT; DIXON, 1982).

A primeira tentativa de desenvolver e padronizar ensaios diagnósticos baseados na determinação de anticorpos específicos foi feita por Mott e Dixon em 1982, num estudo comparativo utilizando uma plataforma ELISA com purificações proteicas diversas, como a CEF6 e MSA1, provenientes do extrato bruto do ovo (SEA). Neste estudo, o antígeno CEF6 além de possuir a maior correlação com a taxa de excreção do ovo em comparação as outras preparações, este antígeno também demonstrou 91,7% de sensibilidade e uma especificidade de 90% (MOTT; DIXON, 1982). Desde então estudos com o CEF6 vem avaliando-o nas

áreas endêmicas de *S. mansoni* no Quênia, Arábia Saudita e Burkina Faso (DOENHOFF *et al.*, 1993; GHANDOUR *et al.*, 1997; SORGHO *et al.*, 2005)

O método direto de ELISA por captura utilizando anticorpos monoclonais foi um dos primeiros a ser usado para auxiliar no critério de cura, pois consegue detectar antígenos circulantes, caracterizando a doença ativa e eliminando o problema da baixa especificidade no diagnóstico através da dosagem de anticorpos (RABELLO, 1997).

Atualmente, existem vários antígenos derivados do *S. mansoni* que foram encontrados na circulação, porém, somente alguns foram bem estudados, com é o caso do Antígeno Aniônico Circulante (AAC) e do Antígeno Catiônico Circulante (ACC), nomeados devido seu comportamento migratório na imunoeletroforese (BERGWERFF *et al.*, 1994; VAN DAM *et al.*, 1994). Num experimento testando a sensibilidade apresentada pelo ACC numa plataforma de ELISA, foi demonstrado que a taxa mais baixa detectável do antígeno no soro foi relacionada a uma excreção de no mínimo 10 ovos por grama de fezes (DE JONGE. *et al.*, 1988; DEELDER *et al.*, 1989). Além disso, os antígenos circulantes de *Schistosoma* desaparecem rapidamente após um tratamento eficaz, podendo ser utilizado para avaliação de cura. Até o momento ensaios disponíveis utilizando CCA têm demonstrado uma confiabilidade moderada no diagnóstico da esquistossomose (EL-MORSHEDY *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2014).

Em geral, o diagnóstico imunológico é sensível e tem como principal utilidade o diagnóstico da esquistossomose com baixa carga parasitária, onde o exame microscópico ainda encontra-se negativo (GRYSEELS, 2012). Além disso, estes ensaios possuem uma elevada sensibilidade devido a uma taxa muito baixa de falso-positivos em zonas não endêmicas, e os níveis de antígenos circulantes geralmente correlacionam-se com o número de ovos excretados (VAN LIESHOUT, *et al.*, 1995).

Entretanto, mesmo possuindo uma boa sensibilidade, a especificidade de muitos dos métodos desenvolvidos não é satisfatória devido a reações cruzadas com outros helmintos, protozoários. Reações imunológicas utilizando extratos antigênicos brutos tendem a gerar uma baixa especificidade, prejudicando desta maneira a confirmação absoluta da infecção (CARVALHO, G. B. F. *et al.* 2011; DOENHOFF, 1982; GOMES *et al.*, 2014; MOTT; DIXON, 1982; RABELLO, 1997; SMITHERS; MONTENEGRO, 1992; WU, 2002)..

Então, variações de ELISA que utilizem antígenos proteicos recombinantes e antígenos derivados de estudos proteômicos representam uma linha de pesquisa promissora no diagnóstico da esquistossomose, porém a grande maioria destes estudos encontra-se na fase experimental. Desta forma, a avaliação de novos antígenos com potencial de utilização

no diagnóstico sorológico da esquistossomose, pode ajudar a superar as limitações na utilização do ELISA para detecção de anticorpos (CARVALHO, *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014).

2.6 Polipeptídeo Sm15

O Sm15 é um polipeptídeo de aproximadamente 15 Kda que foi identificado originalmente por Abath *et al.*, (1993) a partir do isolamento de dois cDNAs (A70 e A184) derivados de uma proteína precursora que possui 1032 aminoácidos, massa molecular de 116,9 kDa e que apresenta em sua sequência repetições em tandem (**Figura 8**). Denominada ‘major tegumental antigen SM15’ e cadastrada no banco de dados proteicos do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através do número de acesso - AAA03033.1. Esta proteína precursora está presente no sincício do *Schistosoma*, parte do tegumento que reveste o verme numa membrana proteica heptalaminar (7 camadas proteicas) (**Figura 9**).

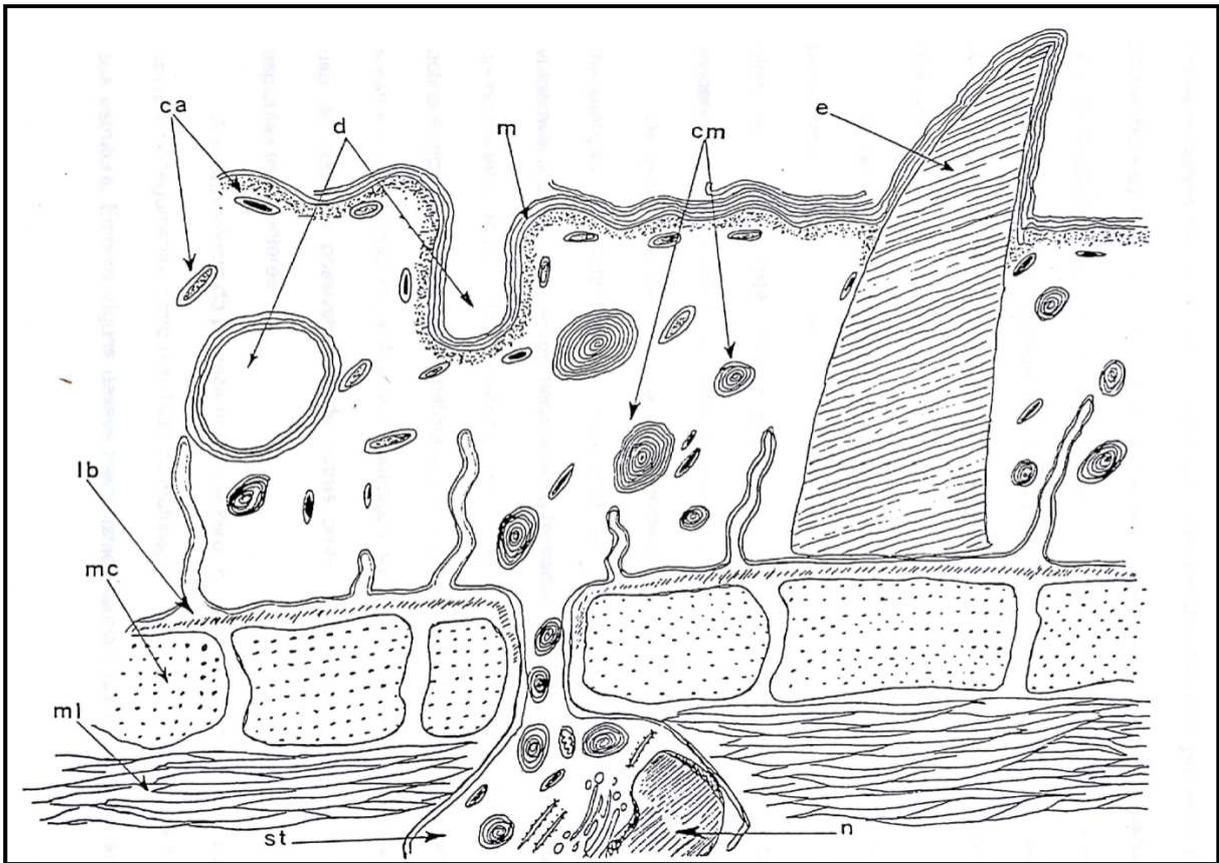
Segundo Abath *et al.* (1994) o polipeptídeo Sm15 está presente em vermes adultos a partir da segunda semana de vida, porém o mesmo polipeptídeo não é encontrado em miracídeos e no esquistossômulo. Além disso, o polipeptídeo Sm15 possui uma sequência de aminoácidos hidrofílica, entretanto o mesmo é purificado na fração em que se utiliza detergente triton x-114, o que sugere que o processamento da sua proteína precursora pode incluir algum tipo de modificação hidrofóbica como, por exemplo, ligação a lipídeos (ABATH *et al.*, 1994). A localização ultraestrutural de Sm15, encontrada utilizando-se anticorpos, indica que esta proteína se encontra no sincício, mas não na membrana externa (ABATH *et al.*, 1997) e a identificação por sequenciamento da região N-terminal da proteína indica que Sm15 se localiza entre os aminoácidos 362 e 497 de seu precursor (WERKHÄUSER, *et al.*, 2000). Análises de bioinformática demonstraram que somente duas sequências disponíveis no GenBank apresentavam homologia com a sequência do Sm15, ambas de espécies do gênero *Schistosoma*. Tal fato indicou que esse polipeptídeo por ser tão específico pudesse apresentar menores taxas de reações cruzadas num teste sorológico. Além disso, em estudos prévios, o polipeptídeo Sm15 apresentou reatividade quando confrontado com soros de animais infectados com *Schistosoma mansoni* (comunicação pessoal), portanto, possuindo assim um grande potencial para abordagens imunoprofiláticas e para testes diagnósticos.

Figura 8 - Sequência da proteína precursora 'major tegumental antigen SM15'

	MGGILSRFSSR	11
	KDEKPADTSRSAATIRKRWSWRSNKKPSDVGGTTVNRSSTMPTRTRLQPTTEEIPEDRKHDDIFDSEHDEKNYSNSVVTNSQNDHT	96
	SQHSSGQQEQHNVEYSNKPIVHEIPGKKDEKQPIQISSSTNEPENKDNVTREISTEEAELLISHALPNQENVGPNGNITGSGTNGS	181
	LTHDNINFNHTEDLIVNKQOLEEKLDHSIHDSGLMMDQQEITKDQNGFFDSTQHHFEDKTDLLKEDDIHSEITGEEIKLGQNPV	266
	YLPSEEEIEEFVHQNIRKHSNEHLKVQNDIIEQGGEENLSTESSNHNEVTQPSVICFYRPNVVEYPPPEEIQLNNDIDEQTYKQQ	351
	TNNISNIQSSGTVGEKDSIHDQVVQNESFECSAELRAFHDLSNNEELPNSELIDKDNKVNFEVETENTLDNVISEHVEQKNAFQET	436
	Repeat 1	
	LEKELSESIMNAGETKIVSADEP PINLNDEIHVEQTENISHPKYTEHDAPIDEEATPNELDKCSSQPGLTYDPVPSLSPITTE	519
	↑ 447	
→	Repeat 2	
	PINLDDMHAEQTEKISHPENMESINLGDEIHVEQTENISHPKYTEHDAPIDEEATPNELDKCSSQPGLTYDPVPSLSPITTE	602
→	Repeat 3	
	PINLDDMHAEQTEKISHPENMESINLGDEIHVEQTENISHPKYTEHDAPIDEEATPNELDKCSSQPGLTYDPVPSLSPITTE	685
	↑ 692	
→	Repeat 4	
	PINLDDMHAEQTEKISHPENMESINLGDEIHVEQTENISHPKYTEHDAPIDEEATPNELDKCSSQPGLTYDPVPSLSPITTE	768
	↑ 788	
→	Repeat 5	
	PINLDDEIHAEQ NEYTSPSERNVNNIPVEKSIHTVLESPTPEVTEYFNSSNESHFTSELVLNEDNKEVTKDVDLEHSTEHFKTE	853
	↑ 858	
	DIHHKQINDTETLTTFEESVSNLHNTLNSTHIDDEIDQHQTLETSHDENHTDVQLNTDIMNVITSENLHTNFINANDEFEDAQS	938
	LVQSVLNNAKEFVFNENNENFENHQSNTINTNLILTNNNSNNDYLTNNNSYINEEDTIEMKQNMKTSMEFDHSDLSSENNQHL	1023
	NNTNDLTIA	1032

Fonte: Adaptado de WERKHÄUSER, *et al.*, (2000).

Nota: Figura demonstrando a sequência da proteína precursora 'major tegumental antigen SM15', evidenciando em negrito a sequência do polipeptídeo Sm15 e as repetições em tandem apresentada pela sua proteína precursora.

Figura 9 - Representação diagramática do tegumento do verme *Schistosoma mansoni*

Fonte: adaptado das anotações pessoais de WERKHÄUSER, R. P.

Nota: A figura acima mostra o desenho esquemático do sincício evidenciando suas estruturas, CA-Corpos Alongados, CM-Corpos Membranosos, D-Depressões superficiais do tegumento, E-Espículas, LB-Lâmina Basal, M-Membrana externa heptalaminar, MC-Fibra Musculares Circulares, ML-Fibras Musculares Longitudinais, ST-Células subtegumentares ou "Cytos" e N-Núcleo.

3 JUSTIFICATIVA

Esquistossomose mansônica é uma parasitose humana em expansão, sendo considerada endêmica em 54 países do mundo. No Brasil esta parasitose é encontrada em 18 estados brasileiros e no Distrito Federal (GAZZINELLI *et al.*, 2002) e estima-se que 4,6% da população esteja infectada, o que torna o Brasil o país da América do Sul com maior número de casos registrados da doença (DE SOUZA, *et al.*, 2012). O Nordeste, além de ser a região brasileira com a maior mortalidade do país (FERREIRA; SILVA, 2007) é a região que apresenta o maior número de indivíduos infectados, (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Em Pernambuco, a área endêmica engloba 102 dos 186 municípios do estado (DOMINGUES; SILVA, 2011). Dada a importância da infecção esquistossomótica e as limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico utilizados atualmente, como a baixa eficácia do padrão ouro em zonas endêmicas, a baixa especificidade dos métodos sorológicos e a falta de métodos moleculares padronizados, justifica-se o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos (DOENHOFF, M. J. *et al.*, 2004; FATAAR *et al.*, 1984; PINTO-SILVA *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 2001). Além disso, a presença de antígenos derivados do *S. mansoni* na circulação sanguínea e nas excretas de hospedeiros e o grande potencial para abordagens diagnósticas do polipeptídeo Sm15, reforçam e encorajam o desenvolvimento do imunodiagnóstico na esquistossomose (ABATH *et al.*, 1994). Portanto, acreditamos que a elucidação da reatividade do polipeptídeo em potencial (Sm15) em humanos é de extrema importância para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas, criando assim, novas possibilidades para realização de triagens sorológicas em zonas endêmicas, para o diagnóstico precoce da doença e métodos não invasivos para diferenciação das formas clínicas aguda e crônicas da doença, a fim de melhorar o acompanhamento terapêutico e a qualidade de vida dos indivíduos infectados.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Produzir o polipeptídeo recombinante Sm15 derivado do *Schistosoma mansoni* e verificar o seu potencial para o desenvolvimento de métodos baseados no diagnóstico imunológico.

4.2 Específicos

- a) Obter o polipeptídeo recombinante Sm15 em sistema de expressão procarioto (*E. coli*).
- b) Avaliar a reatividade do polipeptídeo Sm15, frente aos soros de pacientes esquistossomóticos.
- c) Comparar dos ELISA utilizando os antígenos Sm15 e SEA, através valores de sensibilidade, especificidade, likelihood ratio e curva ROC.
- d) Correlacionar os níveis de reatividade do polipeptídeo Sm15 frente aos anticorpos presentes no soro de pacientes com as formas clínicas aguda e crônica esquistossomose.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho e população de estudo

O desenho de estudo foi do tipo corte transversal com grupos de comparação interna. Pacientes com esquistossomose mansônica de ambos os sexos com idade superior a 18 anos foram selecionados por demanda espontânea no período de dezembro de 2013 à dezembro de 2014 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 pacientes tiveram a confirmação da presença e grau da fibrose periportal através da ultrassonografia abdominal (classificação de Niamey) (RICHTER *et al.*, 2001). Os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com a classificação dos estágios clínicos da esquistossomose. O grupo 1, foi formado por pacientes esquistossomóticos que apresentavam a forma aguda(n=8). O grupo 2 foi constituído por pacientes que apresentaram a esquistossomose na forma clínica crônica(n=67).

5.2 Método de Coleta de Amostra de Material Biológico

Os pacientes que aceitaram participar do estudo, de forma voluntária, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e tiveram 3 ml de seu sangue coletado, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. A coleta de material biológico ocorreu em local apropriado, de acordo com as normas de biossegurança e o sangue coletado foi enviado para o Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM) do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ, onde todos os procedimentos de preparação e estoque dos soros foram realizados.

5.3 Obtenção dos vermes e extração do DNA

Um total de 30 vermes da espécie *S. mansoni*, foram gentilmente cedidos por integrantes do grupo de pesquisa em inovações terapêuticas na esquistossomose, do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM). Estes vermes foram macerados com nitrogênio líquido, utilizando cadinho e pistilo. Então, tiveram seu material genético extraído pelo método do “Trizol Reagent” (Invitrogen life technologies, USA) de acordo com as instruções do fabricante, após essa etapa a amostra foi armazenada à 4°C.

5.4 Amplificação das sequências de DNA – PCR convencional

Análises realizadas em bancos de dados de sequências de DNA indicam que não havia íntrons na sequência do gene da proteína precursora do Sm15. Portanto, a amplificação dos genes pode ser feita diretamente do DNA genômico. Para a amplificação do polipeptídeo Sm15 foi realizada uma reação com volume final de 25µL, contendo tampão da Platinum® pfx DNA polymerase 1x (Invitrogen Life Technologies), 1mM de MgSO₄, 300µM de cada dNTP, 8µM de cada *primer* (*Sm15F* e *Sm15R*) e 0,03 unidades de Platinum® pfx DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) e 30ng de cDNA. Como controle negativo, foram utilizados os reagentes sem adição de DNA:

Tabela 2 - Mistura para PCR convencional do polipeptídeo Sm15, destacando as diferenças entre a utilização para os diferentes tipos de enzimas polimerase Platinum Pfx e Taq Platinum respectivamente

Mix - Sm15	
H ₂ O	15,1 µL
Buffer (10x) - sem cofator	2,5 µL
DNTP's	0,8 µL
MgSO ₄ /MgCl ₂	0,5 µL
Sm15f	0,8 µL
Sm15r	0,8 µL
Taq Platinum Pfx/Taq Platinum	0,5 µL
DNA	4,0 µL

Fonte: Elaborada pelo autor.

O termociclador utilizado foi o “Mastercycler gradient” (EPPENDORFF), e a reação step down foi realizada de acordo com o seguinte programa:

- a) Desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos;
- b) 05 ciclos : { Desnaturação: 95°C por 30 segundos
Anelamento: 60°C por 30 segundos
Extensão: 68/72°C por 60 segundos
- c) 05 ciclos : { Desnaturação: 95°C por 30 segundos
Anelamento: 58°C por 30 segundos
Extensão: 68/72°C por 60 segundos
- d) 20 ciclos : { Desnaturação: 95°C por 30 segundos
Anelamento: 56°C por 30 segundos
Extensão: 68/72°C por 60 segundos
- e) Extensão final à 68/72°C por 5 minutos.

A detecção do produto da PCR foi feita através de corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, posteriormente corado com brometo de etídio. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 1x (Tris-base 0,4M, EDTA 20mM, acetato de sódio 0,13M, pH 8,0).

5.5 Clonagens

O processo de clonagem foi realizado em duas etapas. Na primeira, etapa o fragmento de DNA codificante da Sm15 foi clonado utilizando o kit “pGEM-T Vector System”, o DNA plasmidial obtido foi inserido nas bactérias *Escherichia coli* DH10B por eletroporação e as cepas foram selecionadas em meio LB ágar com 100µg/mL de ampicilina. Os clones positivos foram selecionados pela PCR das colônias crescidas em meio LB ágar e os clones de interesse foram cultivados em meio LB líquido, então a extração do DNA plasmidial foi realizada através da técnica de extração de DNA em pequena escala descrita em Sambrook *et al.* (1989). Os clones positivos obtidos foram analisados por amplificação através de PCR de colônia e por sequenciamento da DNA.

5.6 Sequenciamento de DNA

As construções plasmidiais obtidas foram submetidas ao sequenciamento de DNA no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE (CPqAM/FIOCRUZ-PE), utilizando o sequenciador ABI 3100 genetic analyzer (Applied biosystems). Os resultados foram analisados utilizando os programas ‘SeqMan’, ‘MegAlign’ e ‘EditSeq’ do “DNA Star” (Lasergene) e o programa “Chromas Lite V2.01”.

5.7 Extração do inserto e subclonagem em plasmídeo de expressão

A extração do inserto do plasmídeo pGEMTEasy foi realizada através de uma digestão dupla com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI (New England Biolabs), cujos sítios por serem colocados na sequência dos *primers Sm15F* e *Sm15R* se encontravam flanqueando o inserto. A reação de extração foi realizada com base nas informações fornecidas pelo programa “Double Digest Finder”, o tampão de escolha foi NEBuffer 3.1. O inserto obtido foi ligado com a T4 DNA Ligase aos vetores de expressão pRSETa e pTYB21 e em seguida

foram inseridos em bactérias *E. coli* DH10B por eletroporação. Os clones positivos obtidos foram analisados pela digestão com enzimas de restrição e por sequenciamento da DNA.

5.8 Expressão e purificação do polipeptídeo

Para a expressão dos polipeptídeos, os plasmídeos purificados contendo os genes de interesse foram inseridos em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 Star™ por eletroporação. O cultivo foi realizado no volume 500mL de meio LB com ampicilina (100 µL/mL), até que o meio atingisse uma densidade ótica de no mínimo 0,6 (595nm). O isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM foi utilizado na indução da expressão dos polipeptídeos durante 4 horas.

Após a indução da expressão os 500mL de cultura foram centrifugados a 15000 rcf por 10 min, e o sedimento solubilizado em 30mL tampão fosfato 1x com imidazol a 30mM. Em seguida, as células foram sonicadas a uma amplitude de 50% por 4 tempos de 30 seg com intervalos de 30 seg no gelo. Fizemos uma nova centrifugação a 15000 rcf por 10 min e a fração solúvel foi utilizada na purificação.

As purificações foram feitas através de cromatografia de afinidade por imobilização dos íons metálicos utilizando-se uma coluna de níquel 1mL, HisTrap kit (GE Healthcare Life Sciences) para purificação dos polipeptídeos com cauda de histidinas. Para purificação das proteínas quiméricas fundidas com inteína, a purificação foi realizada por imobilização em resina de quitina utilizando-se o kit IMPACT (New England Biolabs), para ambos os protocolos seguiram as instruções dos respectivos fabricantes. A visualização dos produtos da purificação foi feita através de gel de SDS – PAGE com poliacrilamida a 15%.

5.9 Sequenciamento dos polipeptídeos Sm15 recombinantes

Alíquotas dos polipeptídeos recombinantes ‘Sm15.pTYB21’ (Sm15i) e ‘Sm15.pRSETA’ (6His-Sm15) foram submetidas ao sequenciamento de proteínas na plataforma de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR (ICC/FIOCRUZ-PR), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL™ Hybrid Ion Trap (Thermo Scientific). As amostra proteicas purificadas foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 15% (**Figura 26**) e posteriormente tiveram suas bandas excisadas do gel e estocadas em água ultrapura. Então, as amostras foram enviadas a plataforma de espectrometria de massas do ICC em temperatura ambiente. Após algumas etapas de lavagem e tratamento do gel foi adicionada a tripsina, para que a proteína recombinante pudesse ser

digerida em vários polipeptídeos. Em seguida estes polipeptídeos foram retirados de gel e transferidos para um tampão onde o processo de purificação continuou por mais algumas etapas e, por fim, os polipeptídeos foram colocados no espectrofotômetro para análise. Os resultados, em forma de sequência peptídica, foram utilizados em uma pesquisa por sequências homólogas contra o banco de dados do UniProt.

5.10 Reatividade do polipeptídeo Sm15 por ELISA *in house*

As placas foram sensibilizadas por adsorção física, durante a noite, utilizando 250 ng dos fragmentos peptídicos Sm15 diluídos em solução tamponada de carbonato-bicarbonato (0,02 M Na₂CO₃; 0,03M NaHCO₃; pH 9,6) no volume final de 50µL/poço. A quantidade de proteína foi definida nas etapas de padronização. Os poços das placas sensibilizadas foram lavados quatro vezes com PBS (pH 7,2) Tween-20 0,5% (PBST). O bloqueio das placas foi feito com leite a 5% diluído em PBST por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada quatro vezes com PBST. Em cada poço sensibilizado foi adicionado 100µL dos soros de pacientes diluídos numa proporção de 1:200 em PBST, incubando-se 1 hora a 37°C. Após quatro lavagens com PBST adicionamos 100µL do conjugado anti-IgG humana-peroxidase diluídos na proporção de 1:2000 de em PBST. Após incubação por 1 hora a 37°C e quatro lavagens com PBST, foi adicionado em cada poço 100µL da solução cromógena ABTS (2,2-azino-de [sulfato(6) de 3-etil benzitiazolina]). Nesta etapa a incubação foi à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O controle negativo consistiu de pacientes sabidamente não esquistossomóticos. A reatividade foi avaliada espectrofotometricamente através de leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 405 nm. As leituras e os cálculos das concentrações referentes às dosagens foram realizados com o *software* SkanIt for Multiskan FC 3.1 (Thermo-scientific). Para comparar o desempenho do ELISA-Sm15, foi realizado um ELISA utilizando SEA, descrito previamente pelo nosso grupo (BECK *et al.*, 2008).

5.11 Análise estatística

Os resultados foram obtidos utilizando-se os *softwares* Excel v. 2010, GraphPad Prisma v. 5.0, MedCalc v14.8.1.0, R (<http://www.R-project.org/>) e as conclusões tomadas com o máximo de confiabilidade, ao nível de significância estatística de 5%. A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de tabelas e gráficos apresentando média aritmética, desvio padrão ou erro padrão da média. As variáveis foram testadas quanto às suposições de normalidade e homogeneidade através dos testes de *Shapiro-Wilk* e *Bartlett*,

respectivamente. Observando o pressuposto de normalidade foi utilizado o teste *T-Student* para testar as diferenças de médias, caso contrário, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* quando observando a independência dos dados e o teste de *Wilcox* quando não, testando assim a diferença de medianas. Também foi utilizada a *ANOVA* para testar as diferenças entre os grupos (média), e como post hoc o teste de *Tukey*. Para avaliar o desempenho dos ELISA utilizando como antígenos o polipeptídeo Sm15 e SEA, os parâmetros de sensibilidade, especificidade, likelihood ratio e a curva ROC (Receiver Operating characteristic) foram determinados.

5.12 Aspectos éticos

Todos os pacientes envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, após leitura e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE” (**Apêndice A**), segundo a resolução CNS 196/96, vigente na época do início do estudo. Dados dos prontuários desses pacientes, e resultados de exames como ultrassonografia foram coletados e armazenados em formulário de pesquisa específico (**Apêndice B**). Todos os indivíduos envolvidos neste estudo tiveram 3 ml de seu sangue coletado em tubo seco, através de um sistema adaptado com uma agulha, estéril e descartável para a posterior análise dos níveis de anticorpo específico para a proteína Sm15. O procedimento de coleta de sangue periférico ocorreu em local apropriado, de acordo com as normas de biossegurança e todo material utilizado foi descartável. A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram submetidos, e aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (CPqAM/FIOCRUZ) com anuência do Hospital das Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) (**Anexo A**).

6 RESULTADOS

6.1 Amplificação e clonagem da sequência codificante para o polipeptídeo Sm15

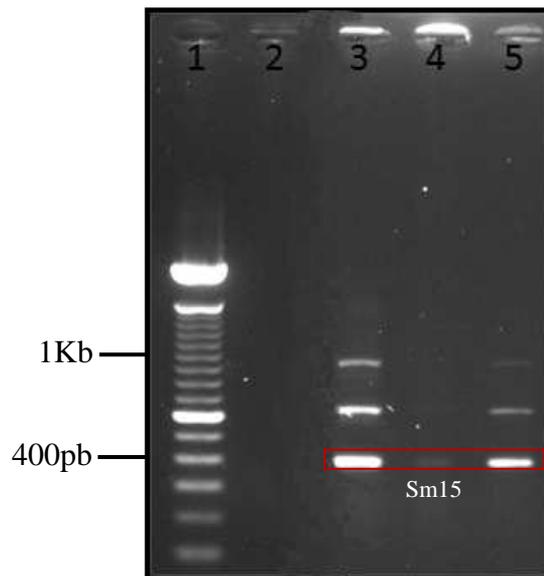
Para amplificação do polipeptídeo Sm15, foram desenhados dois *primers*, *Sm15F* e *Sm15R*, que se anelam a sequência do gene GSM70 (número de acesso, L07513.1). Este gene codifica uma proteína de 1032 aminoácidos que após processada dá origem a Sm15. O *primer Sm15F* anela em apenas um sítio na sequência (**Figura 10**), enquanto o anelamento do *primer Sm15R* ocorre em pelo menos quatro posições diferentes (**Figura 10**) devido a presença de regiões repetitivas. A amplificação do fragmento gênico utilizando esses *primers* apresentou pelo menos três bandas quando utilizadas amostras de vermes adultos provenientes de duas extrações de DNA diferentes (**Figura 11**). As bandas apresentadas no gel têm tamanhos que estão de acordo com o esperado em relação aos sítios de anelamento do *primer Sm15R*. Porém, neste estudo o fragmento de 408pb foi o escolhido para trabalho (**Figura 11**), sendo o mesmo purificado, por excisão do gel (**Figura 12**), e clonado no plasmídeo pGEMTEasy.

Figura 10 - Sequência do gene GSM70 codificante para o polipeptídeo Sm15

```
>DNA
[1083pb]>>>GGAAGTGGAGAGAAA[Sm15F]GATTCAATCCATGATCAGGTTG
TACAAAATGAATCATTGGAATGTTGAGCTGAACTTCGTGCATTCCATGATCT
ATCTAACAAATGAAGAACTCCCTAATTCAGAACTCATTGATAAAGATAACAA
GGTGAATTTTCGTTGAAACTGAGAATACATTAGATAATGTAATTTTCAGAACAT
GTCGAACAGAAAAATGCATTCCAAGAAACGTTGGAAAAAGAGCTCAGTGA
AAGCTTAATGAACGCAGGTGAAACGAAAAATTGTTTCCGCTGATGAGCCACC
TATTAATTTGAAATGATGAAATACATGTAGAACAAACTGAGAATATCTCACA
TCCTAAATACACAGAACATGATGCGCCGATTGACGAGGAGGCAACACCAA
TGAAGTAGAT[Sm15R.408pb]AAATGCTCCTCTCAACCAGGTCTGACATACGATCC
AGTGCCTAGTTTATCTCCTATCACCACGGAACCTATTAATTTGGATGATGAT
ATGCATGCAGAACAAACTGAGAAAAATCTCACATCCTGAAAACATGGAATCT
ATTAATTTGGGTGATGAAATACATGTAGAACAAACCGAGAATATCTCACAT
CCTAAATACACAGAACATGATGCACCGATTGACGAGGAGGCAACACCAAAT
GAAGTAGAT[Sm15R.657pb]AAATGCTCCTCTCAACCAGGTCTGACATACGATCCA
GTGCCTAGTTTATCTCCTATCACCACGGAACCTATTAATTTGGATGATGATA
TGCATGCAGAACAAACTGAGAAAAATCTCACATCCTGAAAACATGGAATCTA
TTAATTTGGGTGATGAAATACATGTAGAACAAACCGAGAATATCTCACATC
CTAAATACACAGAACATGATGCACCGATTGACGAGGAGGCAACACCAAATG
AAAGTAGAT[Sm15R.906pb]AAATGCTCCTCTCAACCAGGTCTGACATACGATCCAG
TGCCTAGTTTATCTCCTATCACCACGGAACCTATTAATTTGGATGATGATAT
GCATGCAGAACAAACTGAGAAAAATCTCACATCCTGAAAACATGGAATCTAT
TAATTTGGGTGATGAAATACATGTAGAACAAACCGAGAATATCTCACATCC
TAAATACACAGAACATGATGCACCGATTGACGAGGAGGCAACACCAAATG
AAAGTAGAT[Sm15R.1155pb]>>>[861pb]end.
```

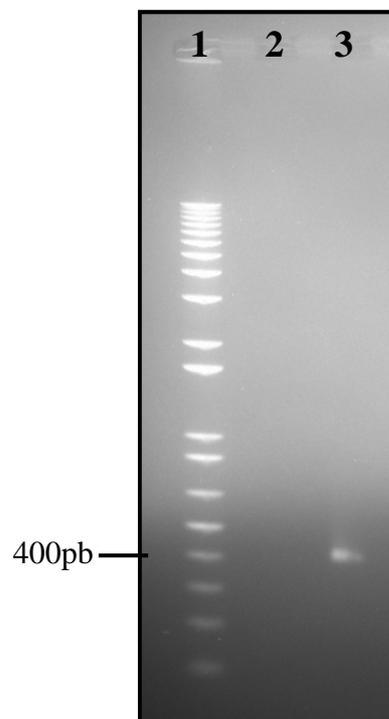
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: A imagem demonstra a sequência parcial de gene GSM70 (entre às bases 1084 e 2237), evidenciando as posições de possível anelamento dos *primers*. A sequência amarela corresponde a única posição onde o *primer Sm15F* pode se anelar e as sequências em verde correspondem as posições, presentes em cada sequência repetitiva em tandem, onde o *primer Sm15R* pode se anelar.

Figura 11 - Amplificação do fragmento gênico correspondente a Sm15

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando os fragmentos de DNA codificantes para o polipeptídeo Sm15 amplificados por PCR. Evidenciando em vermelho as bandas escolhidas de tamanho aproximado 408 pb. 1 – Padrão de peso molecular; 2 – Controle negativo; 3 e 5 – Amplificação do Sm15 com DNA extraído de vermes adultos utilizando a mesma metodologia mas em momento diferentes, mostrando a presença de três bandas de tamanhos diferentes, com aproximadamente 408, 657 e 906 pb, correspondentes a amplificação da região repetitiva do gene GSM70; 4 – Amostra onde a amplificação não foi realizada com sucesso.

Figura 12 - Purificação do fragmento Sm15.408 amplificado do gene GSM70

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando a purificação do produto amplificado do polipeptídeo Sm15, contendo aproximadamente 408 pb. 1 – Padrão de peso molecular; 2 – Controle negativo; 3 – Fragmento de 408 pb codificante para o polipeptídeo Sm15 purificado.

6.2 Seleção de clones positivos por PCR de colônia

Após o processo de clonagem no vetor pGEM-T easy, seis colônias bacterianas foram selecionadas e submetidas à PCR. Nesta reação, a amostra genética é constituída de um clone bacteriano retirado da placa de clonagem, diferenciando-se da PCR convencional onde se usa DNA extraído da amostra. Das seis colônias testadas, apenas duas apresentaram a amplificação de 400 pb que indica a presença do inserto (**Figura 13**)

Figura 13 - Confirmação de clonagem através da amplificação do fragmento gênico Sm15 de colônias bacterianas



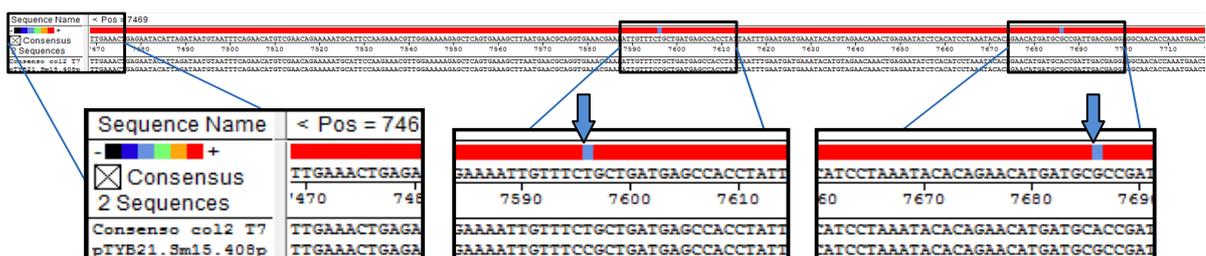
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando o produto amplificado do polipeptídeo Sm15 a partir das colônias bacterianas. 1 – Padrão de peso molecular; 2 – Controle negativo; 4,8 – Colônias positivas para o inserto 3, 5, 6, 7 – Colônias negativas para o inserto.

6.3 Sequenciamento

Após a PCR de colônia, o DNA plasmidial foi extraído e submetido ao sequenciamento para confirmação da clonagem. A sequência obtida possui uma identidade de 99,5% quando alinhada a sequência de Sm15 presente no gene GSM70 (número de acesso L07513.1) (**Figura 14**)

Figura 14 - Alinhamento dos fragmentos gênicos Sm15 (NCBI) e do Sm15 obtido na construção ‘Sm15.pGEM-T Easy’

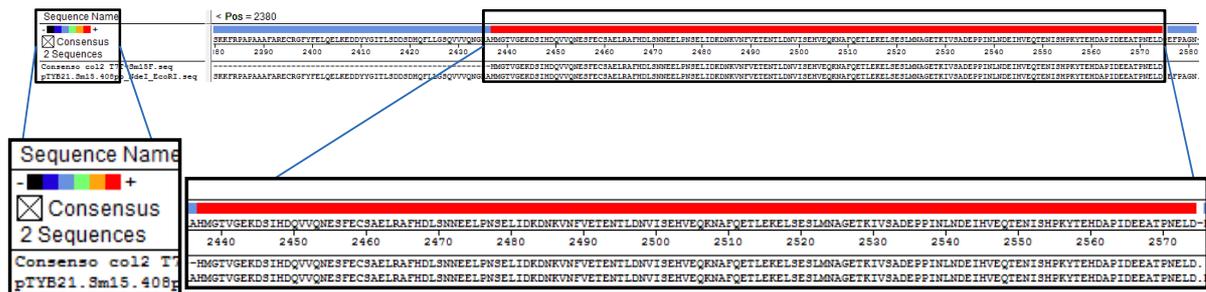


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Alinhamento gerado entre as sequências genéticas provenientes do sequenciamento de clones positivos para o inserto Sm15.408 em pGEMTEasy e o gene GSM70 (número de acesso Lo7513.1) através do método de alinhamento clustal W da ferramenta MegAlign, evidenciando com as setas azuis as mutações de única base identificadas por nossa análise.

A divergência entre as sequências de Sm15 clonadas neste trabalho e a depositadas no bancos de dados de nucleotídeos do NCBI ocorrem devido a presença de duas mutações (**Figura 14**). Porém, devido à degeneração do código genético, elas não alteraram os aminoácidos, quando a sequência de DNA foi traduzida *in silico* (**Figura 15**), demonstrando que as mesmas se configuram como mutações silenciosas e por consequência não causaram mutação de sentido trocado no polipeptídeo obtido em etapas posteriores.

Figura 15 - Alinhamento proteico do gene GSM70 (NCBI) e 'Sm15.pGEM-T Easy' traduzidos *in silico*

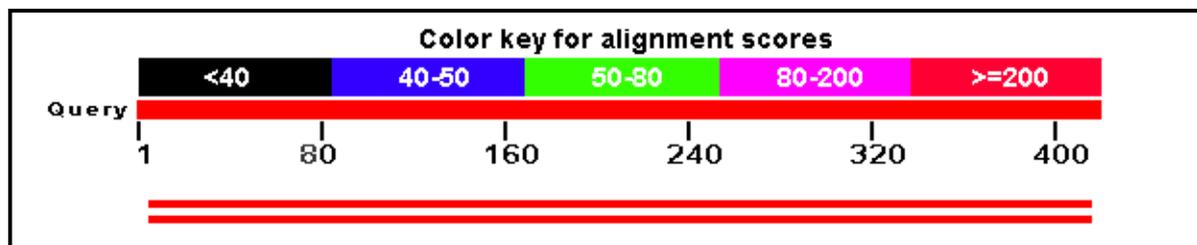


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Alinhamento gerado entre a sequência genética traduzidas *in silico*, provenientes do sequenciamento de clones positivos para o inserto Sm15.408 em pGEMTEasy e o gene GSM70 (número de acesso Lo7513.1) de clustal W da ferramenta MegAlign, evidenciando a região do histograma em vermelho que mostra não haver nenhuma troca de aminoácido mesmo com as mutações apresentadas pela sequência genética do inserto, caracterizando assim uma mutação silenciosa.

Após a confirmação, realizamos um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) realizado entre a sequência do inserto Sm15.408 e a base de dados nr/nt (nucleotídeos não redundantes) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Como resultado encontramos homologia com duas sequências, ambas apresentaram 99% de identidade com a nosso 'query' (**Figura 16**), diferindo somente em 2 nucleotídeos com o mesmo (**Figura 17**).

Figura 16 - Histograma representativo dos 'matches' obtidos pelo BLAST



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Histograma gerado pelo *software* BLAST do NCBI que evidencia, através das barras, os principais 'matches' encontrados para a nossa sequência e ainda os classifica através de um 'score' criado pelo programa, neste caso os únicos dois 'matches' encontrados para nossa sequência apresentam o 'score' máximo caracterizado pela cor vermelha das barras.

Figura 17 - Características das sequências que geraram ‘matches’ no BLAST

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Schistosoma mansoni strain Puerto Rico chromosome 1, complete genome	743	1322	97%	0.0	99%	HE601624.1
<input type="checkbox"/> Schistosoma mansoni major tegumental antigen SM15 (GSM70) gene, complete cds	743	1322	97%	0.0	99%	L07513.1

Schistosoma mansoni strain Puerto Rico chromosome 1, complete genome				Schistosoma mansoni major tegumental antigen SM15 (GSM70) gene, complete cds			
Sequence ID: emb HE601624.1 Length: 65476681 Number of Matches: 4				Sequence ID: gb L07513.1 SCMMTEGANT Length: 4700 Number of Matches: 4			
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Score	Expect	Identities
743 bits(402)	0.0	406/408(99%)	0/408(0%)	Plus/Minus	743 bits(402)	0.0	406/408(99%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Tabela gerada pelo *software* BLAST do NCBI que nos mostra as principais informações do alinhamento, como o nome da sequência que apresentou ‘match’, o grau de identidade entre as sequências (quadrado vermelho) e a probabilidade do ‘match’ encontrado, ser ao acaso.

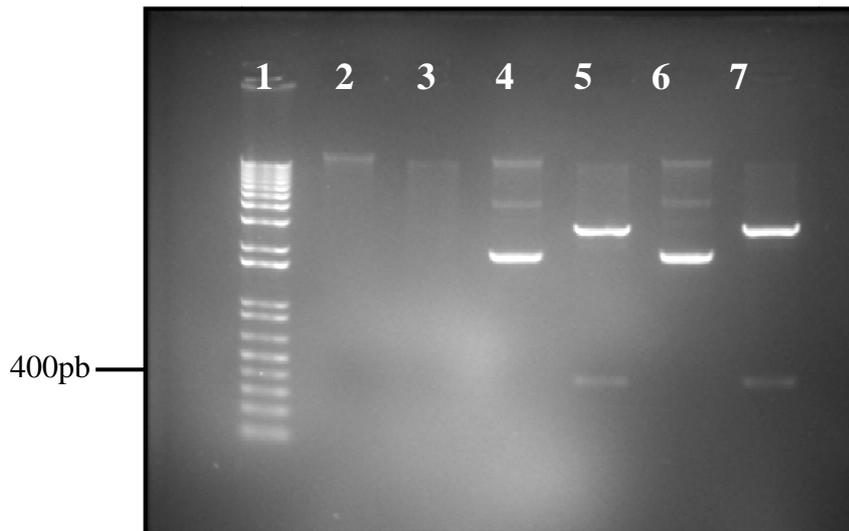
6.4 Subclonagem em vetor de expressão proteica

Nos desenhos de construções para expressão em *E. coli*, foram utilizados dois plasmídeos: pRSETa e pTYB21. Esses plasmídeos juntamente com a construção ‘Sm15.pGEMTEasy’ foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. A digestão de ‘Sm15.pGEMTEasy’ revelou a presença de duas bandas, uma relativa ao pGEM-T Easy de tamanho aproximado de 3000pb e a segunda ao fragmento que codifica Sm15 de 400pb (**Figura 18, canaletas 5 e 7**). O fragmento de 400pb e os plasmídeos pRSETa e pTYB21 digeridos foram purificados e utilizados para a realização das duas construções utilizando a ‘T4 DNA Ligase’. Após isso, foram inseridos na bactérias *E. coli* DH5- α por eletroporação.

Cinco colônias foram selecionadas para se verificar a clonagem no plasmídeo pTYB21, o DNA plasmidial foi extraído e foram feitas duas digestões: uma simples com a enzima *HindIII* e uma dupla com o par *NdeI* e *EcoRI*. Na digestão com *HindIII*, há dois sítios de restrição: um no plasmídeo e um segundo no inserto. Dessa forma, caso não haja inserto, haverá apenas uma banda referente ao plasmídeo de aproximadamente 7500pb. Se houver inserto, a digestão produzirá duas bandas: uma de cerca de 1800pb e outra de 6100pb. O produto da digestão do DNA plasmidial das cinco colônias testadas revelou a presença de duas bandas (**Figura 19, canaletas 3, 4, 5, 6 e 7**). Para digestão dupla com *NdeI* e *EcoRI*, a digestão teórica dos plasmídeos contendo o inserto revelam a presença do plasmídeo de 7500 pb e do inserto de 400pb enquanto que plasmídeos vazios digeridos possuem apenas uma banda de 7500pb. Das cinco amostras de DNA plasmidial testadas, quatro apresentaram a digestão de duas bandas condizente com a presença do inserto (**Figura 19, canaletas 9, 10, 11 e 13**). Em uma das amostras, houve alguma falha na digestão (**Figura 19, canaleta 8**).

Amostras de DNA plasmidial foram extraídas de três colônias possivelmente positivas para a clonagem de Sm15 em pRSETa. As amostras foram digeridas com *NdeI* e *EcoRI*. A digestão teórica para os clones positivos possui uma banda referente ao plasmídeo de cerca de 5700pb e uma banda referente ao inserto de 400pb. Apenas um dos três clones apresentou esse padrão (**Figura 20**). Os outros dois clones apresentaram a digestão compatível com a digestão do pRSETa vazio que é apenas uma banda de 5700pb (**Figura 20**).

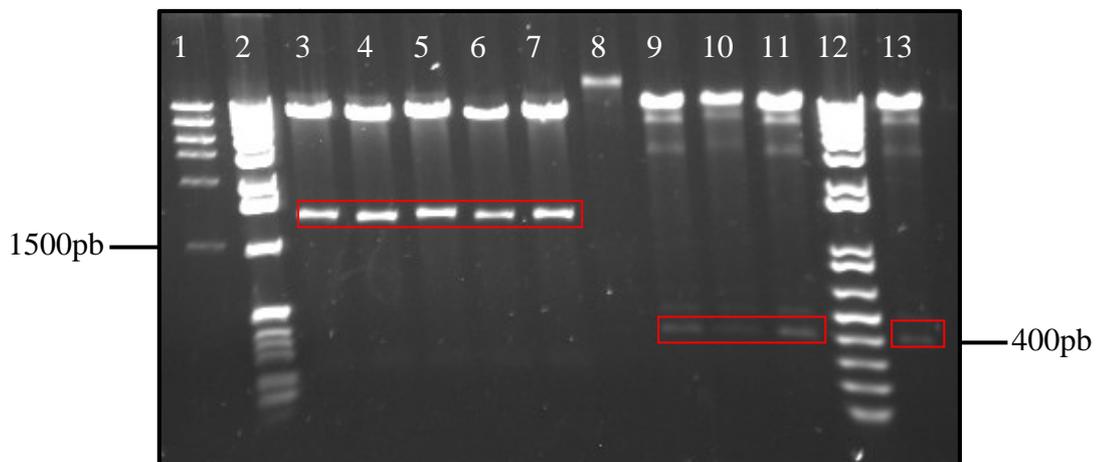
Figura 18 - Digestão dupla com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*



Fonte: Elaborada pelo autor.

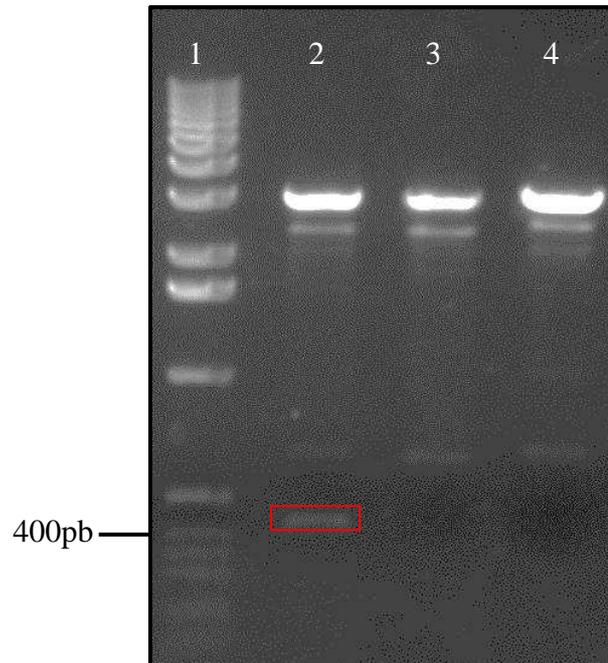
Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando a digestão da construção Sm15+pGEM-T. 1 – Padrão de peso molecular; 2, 3 – Brancos; 4,6 – Construção Sm15+pGEM-T na forma circular; 5, 7 – Plasmídeo pGEM-T e inserto Sm15 digeridos, banda liberada.

Figura 19 - Esquemas de digestão para certificação de clonagem da construção ‘Sm15.pTYB21’



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando os esquemas de digestão para certificação da clonagem em vetor de expressão pTYB21. 1, 2 e 12 – Padrões de peso molecular; 3, 4, 5, 6 e 7 – Digestões realizadas com a enzima ‘Hind III’, mostrando a banda liberada com tamanho esperado de aproximadamente 1500 pb; 8, 9, 10, 11 e 13 – Digestões realizadas com as enzimas ‘Nde I’ e ‘EcoRI’, evidenciando a banda de tamanho aproximado de 408 pb correspondente a região codificadora da proteína Sm15.

Figura 20 - Esquema de digestão para certificação de clonagem da construção 'Sm15.pRSETA'

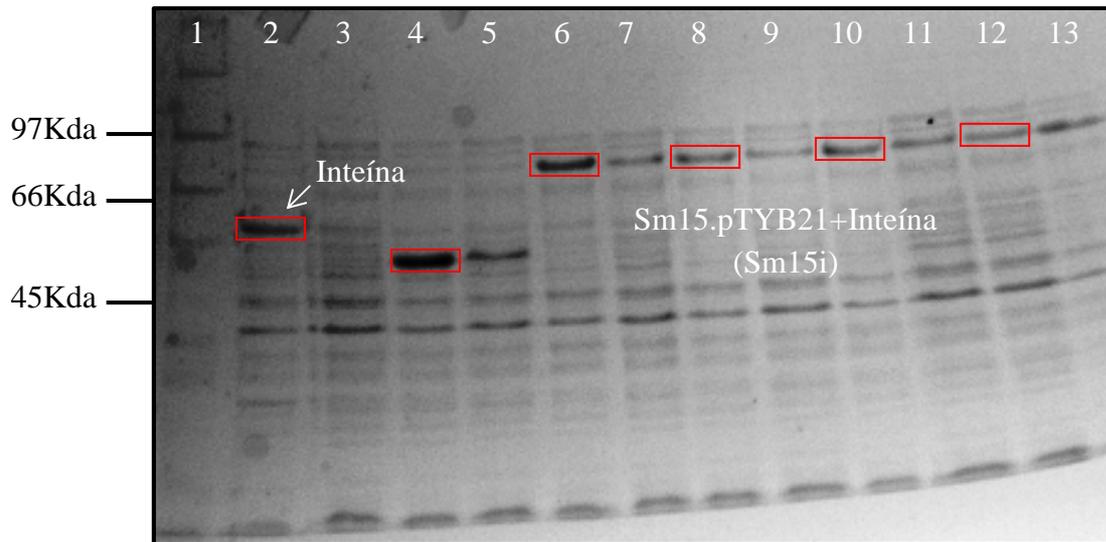
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio demonstrando a certificação da clonagem em vetor de expressão pRSETA. 1 – Padrão de peso molecular; 2 – Digestões realizadas com as enzimas 'Nde I' e 'EcoRI', evidenciando a banda de tamanho aproximado de 408 pb correspondente a região codificadora da proteína Sm15 (vermelho); 3 e 4 – Clones negativos para clonagem.

Além da digestão, amostras do DNA plasmidial de todos os clones positivos foram sequenciadas e confirmadas fragmentos de DNA codificante da proteína Sm15, previamente obtidos na construção 'Sm15.pGEM-T Easy' inclusive com a mesmas mutações silenciosas presentes anteriormente (**Figuras 14 e 15**).

6.5 Expressão e indução proteica

Inicialmente foi realizada uma indução em pequena escala da proteína recombinante Sm15i para que pudéssemos padronizar e aperfeiçoar o processo de indução final, em larga escala. . Nesta indução, foi avaliada a expressão da proteína Sm15i em fusão com a proteína inteína a partir da inoculação de diferentes clones bacterianos contendo o plasmídeo Sm15.pTYB21 num volume de 20 mL de meio LB contendo ampicilina. A proteína correspondente ao polipeptídeo Sm15.408 fusionado a proteína quimérica 'inteína.CDB' teve massa molecular predita em 74.3 kDa, no entanto os polipeptídeos expressos apresentaram um tamanho próximos a 97Kda (**Figura 21**).

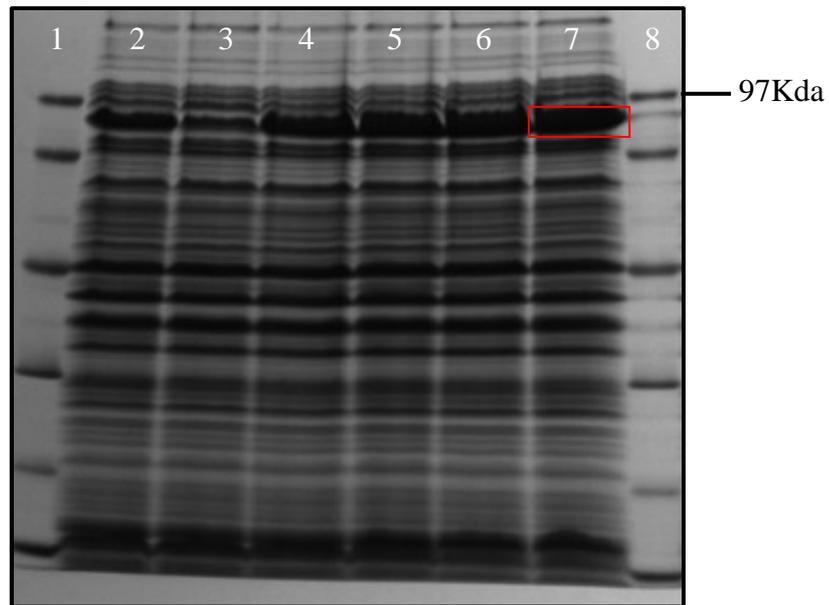
Figura 21 - Padronização para indução da proteína recombinante Sm15i

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Gel de poliacrilamida a 15 % demonstrando os resultados da mini-indução realizada para aperfeiçoamento e padronização da indução em larga escala. 1 – Padrão de peso molecular (LMW); 2 – Controle Negativo (IPTG +), evidenciando em vermelho a inteína.CDB com tamanho aproximado de 55 Kda; 3 – Controle Negativo (IPTG -); 4 – Controle positivo (IPTG +), evidenciando a proteína ‘LmG3CT’; 5 – Controle positivo (IPTG -); 6, 8, 10 e 12 – Proteínas recombinantes Sm15.408+inteína.CDB, com tamanho aproximado de 90 Kda (IPTG +); 7, 9, 11 e 13 – Proteínas resultantes de vazamento do plasmídeo (IPTG -).

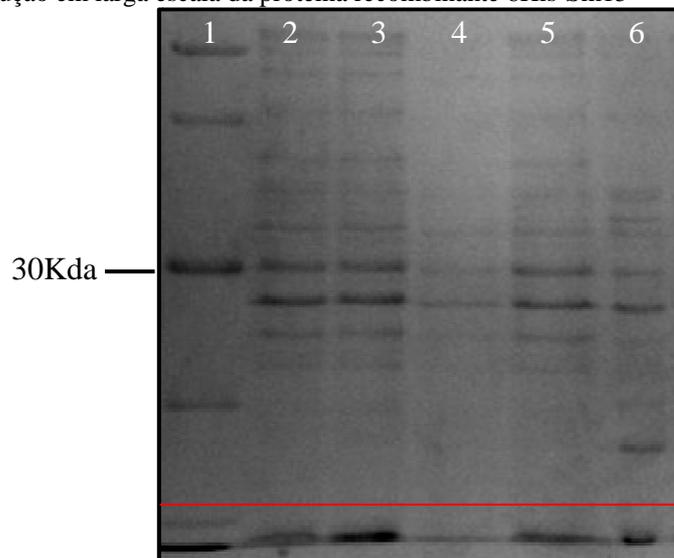
Em seguida, iniciamos a produção da proteína recombinante em larga escala utilizando a colônias bacterianas que apresentaram melhores resultados. Então, realizamos a indução em expressão em 500 mL do meio de cultura LB suplementado de ampicilina e após o processo de indução pudemos observar que a proteína recombinante Sm15i foi produzida no tamanho previamente observado (**Figura 22**).

Em paralelo, as etapas de indução do polipeptídeo recombinante 6His-Sm15 a partir da construção Sm15.pRSETA. Porém, em gel de poliacrilamida a 15 e a 20 % não conseguimos identificar a indução da proteína na massa molecular predita de 19.7 kDa dos clones bacterianos contendo o plasmídeo Sm.15pRSETA quando comparados ao controle utilizado, que consistiu de um clone transformado somente com o plasmídeo pRSETA (**Figura 23**).

Figura 22 - Produção em larga escala da proteína recombinante Sm15i

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Gel de poliacrilamida a 15 % demonstrando os resultados indução em larga escala da proteína quimérica Sm15i. 1, 8 – padrão de peso molecular (LMW); 2 – Controle negativo da indução, sem IPTG; 3 – Proteína em T_0 (tempo zero); 4 – Proteína em T_1 (1ª hora pós IPTG); 5 – Proteína em T_2 (2ª hora pós IPTG); 6 – Proteína em T_3 (3ª hora pós IPTG); 7 – Proteína em T_4 (4ª hora pós IPTG).

Figura 23 - Produção em larga escala da proteína recombinante 6His-Sm15

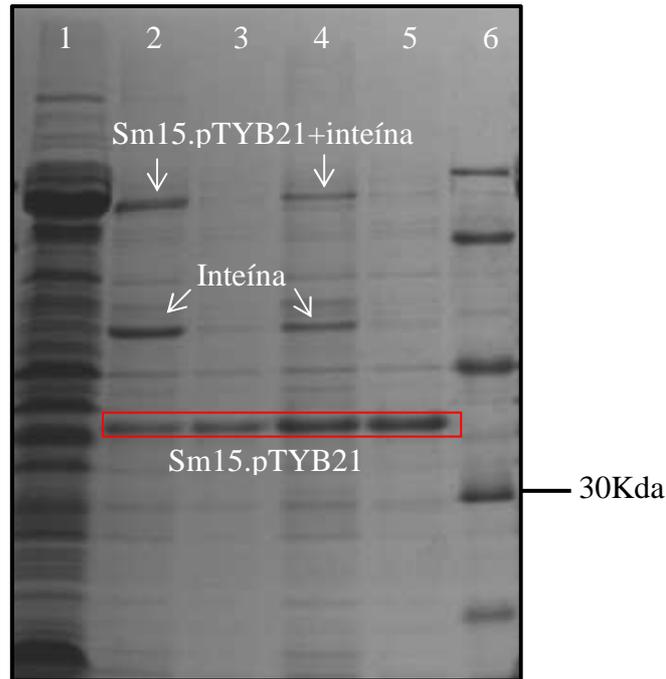
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Gel de poliacrilamida a 15 % demonstrando os resultados indução em pequena escala da proteína quimérica 6His-Sm15, evidenciando onde esperávamos as bandas (linha vermelha). 1 – padrão de peso molecular (LMW); 2 e 4 – Clones com a proteína 6His-Sm15 e IPTG negativo; 3 e 5 – Clones com a proteína 6His-Sm15 e IPTG positivo; 6 – Controle negativo de indução, clone com o pRSETA.

6.6 Purificação proteica

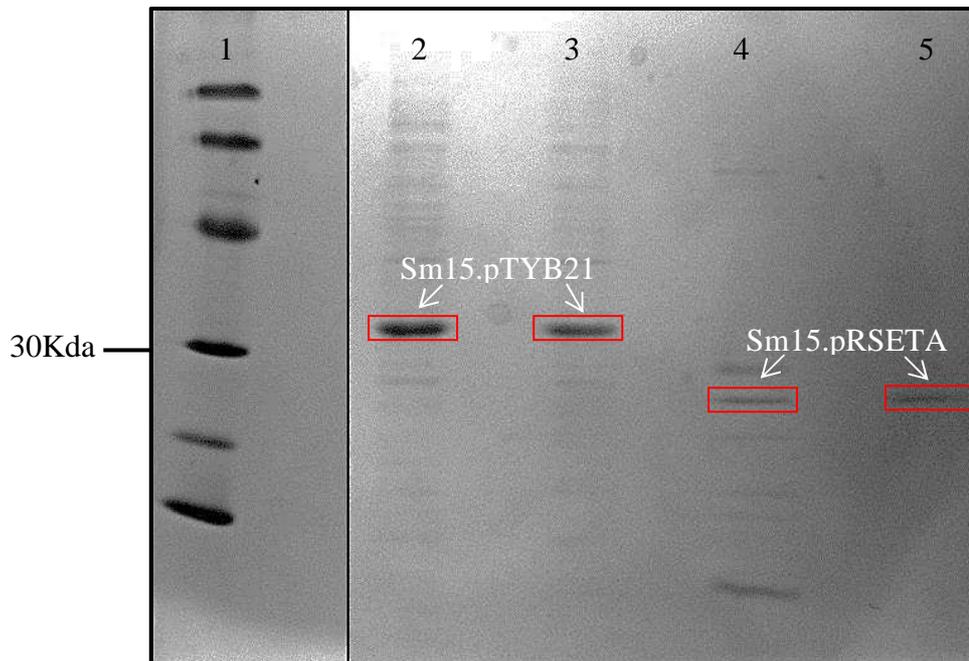
A purificação da proteína Sm15i foi realizada utilizando o kit IMPACT (New England Biolabs), desenvolvido especificamente para purificar proteínas a partir de construções no vetor expressão pTYB21. Este vetor expressa juntamente com a proteína de interesse uma proteína quimérica, que consiste da inteína adicionada de um domínio de ligação à quitina (CBD). Então, no processo de purificação as amostras são ligadas a uma resina de quitina pelo CBD e são submetidas a processos seriados de lavagem. Após as lavagens, com auxílio de um agente redutor a atividade de auto clivagem da inteína é ativada liberando então a proteína de Sm15i para eluição, esta proteína apresentou massa molecular aproximadamente de 30 kDA, apesar da Sm15i não ser a única banda encontrada após a purificação, ela é a proteína majoritária e após a realização da diluição para a etapa de avaliação por ELISA, as bandas minoritárias estarão diluídas ao ponto de não interferirem nas reações (**Figura 24**).

Apesar de não termos visualizado o polipeptídeo recombinante 6His-Sm15 realizamos sua purificação, a partir da indução em larga escala do mesmo, utilizando o HisTrap kit (GE Healthcare Life Sciences) desenvolvido para a purificação de polipeptídeos com cauda de histidinas, como os polipeptídeos obtidos pelo vetor pRSETA. O processo de purificação deste kit baseia-se em cromatografia de afinidade por imobilização dos íons metálicos utilizando uma coluna de níquel. Após algumas etapas de lavagens com tampão específico, utilizamos uma substância quelante, para competir com a proteína recombinante pelos íons metálicos e desta maneira eluímos a proteína recombinante que também apresentou massa molecular aproximada a banda de 30 kDA do peso molecular (**Figura 25**). Após os processos de purificação, obtivemos rendimentos aproximados de 1,5 mg e 2,75 mg de proteína recombinante para a 6His-Sm15 e Sm15i respectivamente.

Figura 24 - Purificação da proteína recombinante Sm15i através do sistema IMPACT

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Gel de poliacrilamida a 15 % demonstrando os resultados da purificação da proteína quimérica ‘Sm15.pTYB21+inteínaCBD’, evidenciando em vermelho a proteína recombinante ‘Sm15.pTYB21’. 1 – Aliquota pré-purificação; 2 – Resina após 20 horas de incubação com agente redutor; 3 – Tampão de eluição após 20 horas de incubação com agente redutor; 4 – Resina após 40 horas de incubação com agente redutor; 5 – Tampão de eluição após 40 horas de incubação com agente redutor; 6 – Padrão de peso molecular.

Figura 25 - Comparação de peso molecular entre Sm15i e 6His-Sm15

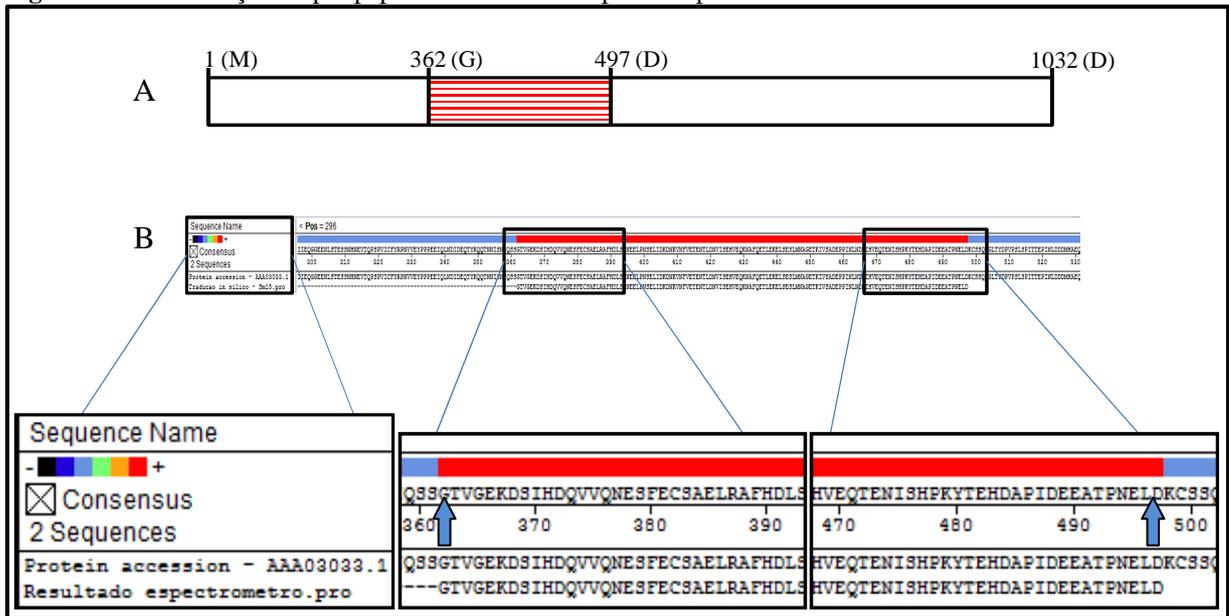
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% demonstrando as purificações das proteínas recombinantes Sm15i e ‘Sm15.pRSETA’. 1 – Padrão de peso molecular (LMW); 2 e 3 – ‘Sm15.pTYB21’; 3 e 4 – ‘Sm15.pRSETA’.

6.7 Sequenciamento das proteínas recombinantes obtidas

Após o processo de purificação dos polipeptídeos Sm15i e His-Sm15, constatamos que as proteínas recombinantes não apresentavam a massa molecular predita de de 15.9 kDA (pós-clivagem) e 19.7kDA respectivamente. Entretanto, elas apresentavam tamanhos superiores a 30 kDA (Sm15i) e inferior a 30 kDA (His-Sm15). Para confirmar que estas proteínas de fato se tratavam de duas diferentes Sm15 recombinantes que migraram diferentemente do tamanho predito, duas alíquotas de cada purificação foram submetidas ao sequenciamento de proteínas na plataforma de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR (ICC/FIOCRUZ-PR). O sequenciamento demonstrou que as duas diferentes proteínas eram as proteínas Sm15, através da análise da busca de sequencias similares no banco de dados UniProt. Estas análises também indicaram que os polipeptídeos expressos além de estarem localizados na posição correta da proteína precursora, entre os aminoácidos 362 e 497, o mesmo não apresentou nenhuma diferença em relação à sequência proteica original (**Figura 26**).

Figura 26 – Localização do polipeptídeo Sm15.408 na proteína precursora



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: A) Desenho esquemático da localização do polipeptídeo Sm15.408 na proteína precursora. B) Alinhamento de sequência entre a proteína AAA03033.1 e o resultado do sequenciamento proteico, demonstrando a integridade do polipeptídeo obtido e confirmando seu início e fim (setas azuis).

6.8 População de estudo

Foram incluídos 75 pacientes, dentre os quais 54,7% foram mulheres e 45,3% foram homens. Quando classificados de acordo com suas formas clínicas, 10,7% os pacientes se

encontravam na forma aguda e 89,3% na forma crônica. Ao subgruparmos a forma crônica nas suas três classificações EH, EHI e EHE, observamos que o maior percentual de pacientes (76,1%) se encontrava na fase de maior gravidade a EHE. Com relação à idade dos pacientes verificamos uma mediana de 56 anos, porém quando divididos em paciente agudos e crônicos as medianas observadas foram de 31,5 e 58 anos, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Características demográfico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo

Variáveis	Pacientes agudos	Pacientes Crônicos		
	N = 8	EH	EHI	EHE
Homens N = 34	2 (2,7%)	3 (4,5%)	32 (42,7%)	6 (8,9%)
Mulheres N = 41	6 (8%)	-	35 (46,6%)	23 (34,3%)
Idade Med. (min/máx)	31,5 (19/79)	61 (50/70)	58 (22/86)	58 (22/86)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: N - Número absoluto de pacientes; (%) - Porcentagem referente ao número de pacientes num determinado grupo; Med. - Mediana apresenta no grupo; (mín/máx) - Valores mínimo e máximo, respectivamente, observados no grupo; EH - Pacientes com quadro clínico de Esquistossomose Hepática; EHI - Pacientes com quadro clínico de Esquistossomose Hepatointestinal; EHE - Pacientes com quadro clínico de Esquistossomose Hepatoesplênica.

Tabela 4 - Características geográfico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo

Variáveis	Pacientes		
	N = 75		
Localidade	ZM 66 (88%)	RMR 5 (6,7%)	OE 4 (5,3%)
Último contato com rio	Atual 12 (16%)	1 a 9 anos 18 (24%)	≥ 10 anos 45 (60%)
Tratamento	Nunca realizou 38 (50,7%)	1 a 2 vezes 33 (44%)	≥ 3 vezes 4 (5,3%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: N - Número absoluto de pacientes; (%) - Porcentagem referente ao número de pacientes num determinado grupo; Localidade - Região onde se localiza a coleção hídrica infectada e a residência dos indivíduos; ZM - Zona da mata pernambucana; RMR - Região metropolitana do Recife; OE - outros estados.

Todos os pacientes incluídos neste estudo infectaram-se ao entrar em contato com coleções hídricas contaminadas. Com relação à localização das coleções hídricas a grande maioria dos pacientes se infectou na zona da mata pernambucana (88%). Embora, grande parte dos pacientes entenda a importância de evitar o contato com a água contaminada e uma possível reinfecção, pois 60% dos pacientes incluídos na pesquisa evitou o contato com rios há no mínimo 10 anos. É surpreendente que apesar de entenderem a gravidade da infecção, os

pacientes não busquem por tratamento, pois, aproximadamente metade dos pacientes infectados nunca se tratou com relação à esquistossomose (50,7%), (**Tabela 4**).

Ao avaliar alguns indicadores socioeconômicos relativos aos pacientes esquistossomóticos incluídos neste estudo, verificamos que a maioria dos participantes possuíam uma renda familiar entre 1 e 2 salários mínimos (81,3%) com o nível de escolaridade estagnado no ensino fundamental incompleto (54,7%). A maioria dos indivíduos que participaram deste estudo declarou que possuía saneamento básico em sua residência (74,7%) (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Características socioeconômicas dos indivíduos incluídos neste estudo

Variáveis	Pacientes N = 75						
	SE	EFI	EFC	EMI	EMC	ESI	ESC
Escolaridade	15 (20%)	41 (54,7%)	5 (6,7%)	2 (2,7%)	10 (13,3%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)
Renda familiar	< 1 SM		1 a 2 SM		3 a 4 SM		> 4 SM
	5 (6,7%)		61 (81,3%)		6 (8%)		3 (4%)
Saneamento	Não			Sim			
	19 (25,3%)			56 (74,7%)			

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: N – Número absoluto de pacientes; (%) – Porcentagem referente ao número de pacientes num determinado grupo; SE – Sem escolaridade; EFI – Ensino fundamental incompleto; EFC – Ensino fundamental completo; EMI – Ensino médio incompleto; EMC – Ensino médio completo; ESI – Ensino superior incompleto; ESC – Ensino superior completo; SM – Salário mínimo.

6.9 Padronização do ELISA

No procedimento de padronização da técnica foram avaliadas a concentração do antígeno (5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL), diluições do anticorpo (1:1000, 1:2000 e 1:3000) e a diluição de soros dos pacientes (1:100, 1:200 e 1:400). Durante o processo de padronização foram testados 27 variações do teste de ELISA, sempre testando uma única variável por vez (**Tabela 6**).

Quadro 2 - Variações realizadas durante o processo de padronização do ELISA - Sm15

Variações do ELISA Sm15			Ag: 5µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:2000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:3000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:4000
Ag: 5µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:2000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:3000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:4000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:2000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:3000	Ag: 5µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:4000
Ag: 10µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:2000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:3000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:4000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:2000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:3000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:4000
Ag: 10µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:2000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:3000	Ag: 10µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:4000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:2000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:3000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:100 Ac: 1:4000
Ag: 20µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:2000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:3000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:200 Ac: 1:4000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:2000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:3000	Ag: 20µg/mL Soro: 1:400 Ac: 1:4000

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Tabela que descreve todas as variações de ELISA testadas durante o processo de padronização do teste utilizando a proteína recombinante 'Sm15' como antígeno, evidenciando em vermelho a variação escolhida após o término das padronizações. Ag – Concentração do antígeno; Soro – Diluição do soro dos pacientes em PBST; Ac – Diluição do anticorpo em PBST.

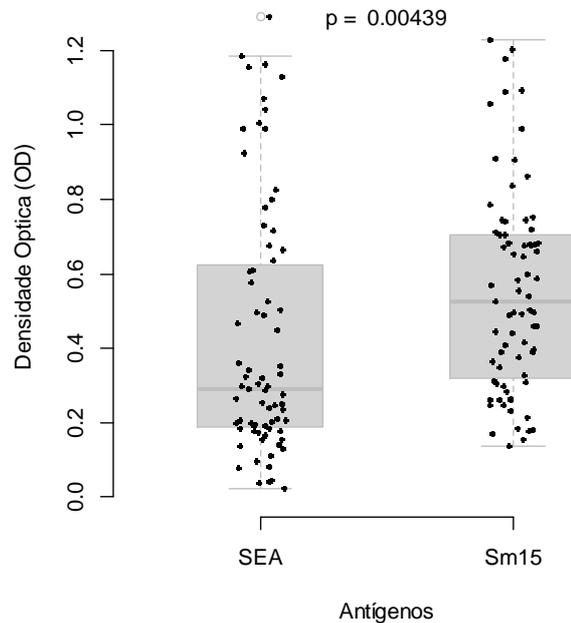
Após resultados, foi estabelecido que a melhor variação de ELISA dentre todos os testados seria aquele com a concentração do antígeno de 5 µg/mL, diluição do soro a de 1:200 e do anticorpo contra fração IgG de 1:2000.

6.10 Resultados do ELISA e análise estatística

Após o término das etapas de padronização e o estabelecimento das melhores condições para a realização do ELISA, avaliamos a reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos incluídos neste estudo frente aos antígenos Sm15 e SEA (antígeno obtido previamente pelo nosso grupo). Com a obtenção dos resultados e realização da análise estatística, pudemos confirmar que o polipeptídeo Sm15 apresentou-se mais reativo frente aos soros dos pacientes, do que o extrato bruto SEA (**Gráfico 1**).

Além da maior reatividade, a análise estatística realizada demonstrou que o polipeptídeo recombinante Sm15 possui a capacidade de diferenciar os pacientes entre as formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose (**Gráfico 2**). Entretanto, quando analisamos o extrato bruto SEA verificamos que este, quando utilizado como antígeno, não é capaz de promover a diferenciação entre as formas clínicas da doença (**Gráfico 3**).

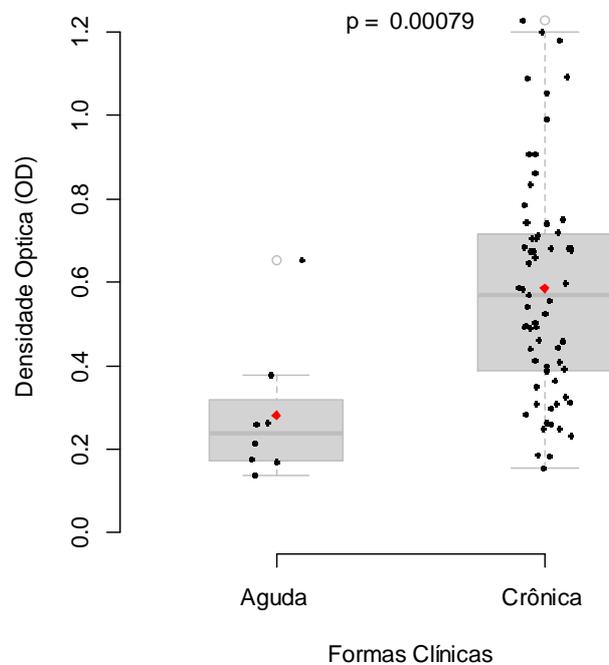
Gráfico 1 – Comparação através de ELISA entre as reatividades do polipeptídeo recombinante Sm15 e do SEA frente a soros de pacientes esquistossomóticos de diversas formas clínicas da doença



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: BoxPlot demonstrando a comparação entre as reatividade (DO) apresentadas pelo antígeno Sm15 e pelo extrato bruto SEA, evidenciando as medianas de reatividade encontradas entre os dois antígenos (linhas no interior do retângulo ($p < 0,05$)). Os pontos representam as reatividades individuais dos pacientes.

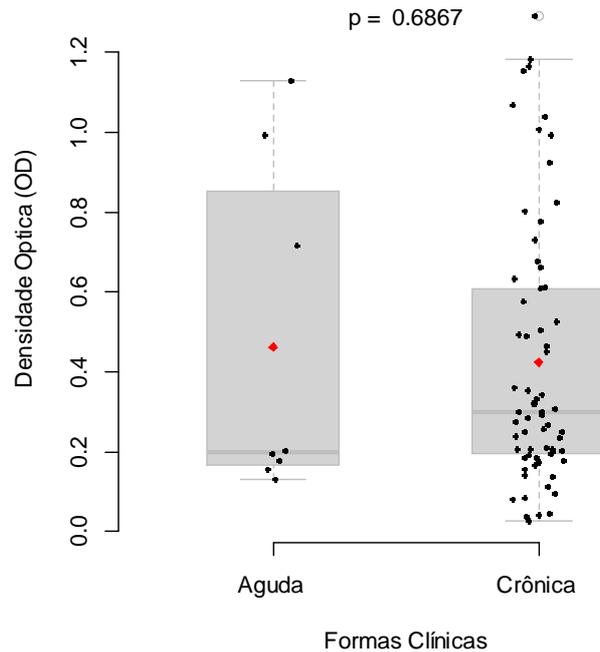
Gráfico 2 – Diferenciação através de ELISA de pacientes esquistossomóticos com as formas clínicas aguda e crônica, utilizando como antígeno o polipeptídeo recombinante Sm15



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: BoxPlot demonstrando a diferenciação dos pacientes entre as formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose pelo antígeno Sm15. Evidenciando as medianas de reatividade encontradas nos dois grupos (linhas no interior do retângulo) ($p < 0,05$). Os pontos pretos representam as reatividades individuais dos pacientes, sendo o ponto vermelho a média de todas as reatividades encontradas.

Gráfico 3 – Diferenciação através de ELISA de pacientes esquistossomóticos com as formas clínicas aguda e crônica, utilizando como antígeno o SEA



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: BoxPlot demonstrando a diferenciação dos pacientes entre as formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose utilizando a reatividade apresentada pelo extrato bruto SEA, evidenciando as medianas de reatividade encontradas nos dois grupos (linhas dentro do retângulo) ($p < 0,05$). Os pontos pretos representam as reatividades individuais dos pacientes, sendo o ponto vermelho a média de todas as reatividades encontradas.

Com a finalidade de realizar uma comparação entre os desempenhos do ELISA-Sm15 e do ELISA-SEA, foram estabelecidos os valores de sensibilidade 76,12% e 70,15%, especificidade 87,50% e 62,50%, respectivamente e as likelihood ratios positivas e negativas (**Figura 27**). Além disso, foram estabelecidas as curva ROC (**Figura 28**) e plotadas num gráfico para a realização da comparação dos dois testes (**Gráfico 4**).

Figura 27 – Valores de sensibilidade, especificidade e likelihood ratio calculadas para os antígenos Sm15 e SEA

Antígeno	Sensibilidade	IC 95%	Especificidade	IC 95%	+LR	-LR
Sm15	76,12	64,1 - 85,7	87,50	47,4 - 97,9	6,09	0,27
SEA	70,15	57,7 - 80,7	62,50	24,7 - 91,0	1,87	0,48

Fonte: Elaborada pelo autor.

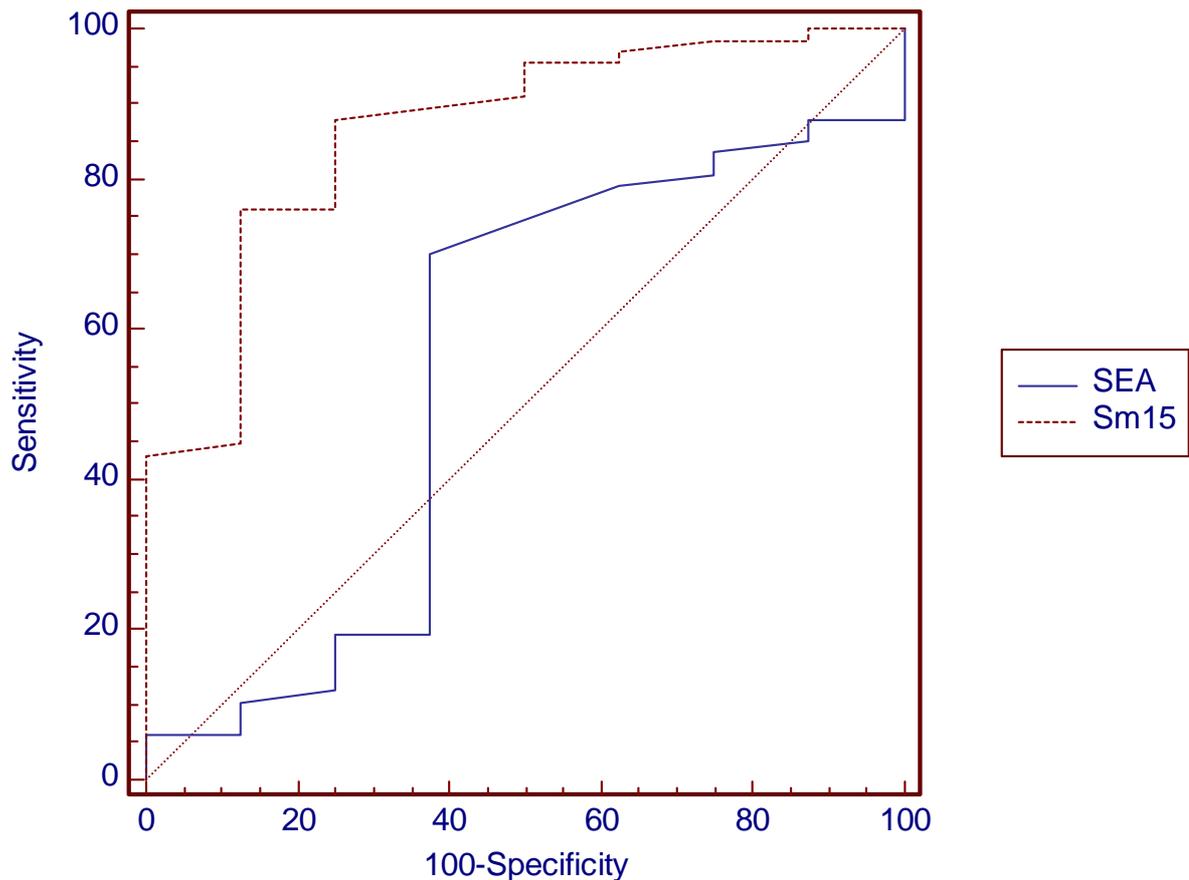
Nota: Valores de sensibilidade, especificidade e likelihood ratio calculadas pelo programa MedClac para a utilização do polipeptídeo recombinante Sm15 e para o SEA como antígenos para o ELISA. +LR – likelihood ratio para resultado positivo; -LR – likelihood ratio para resultado negativo; IC 95% – intervalo de confiança a 95%.

Figura 28 – Características estatísticas das curvas ROC estabelecidas para os antígenos Sm15 e SEA

Antígeno	AAC	DP	IC 95%
SEA	0,548	0,105	0,428 - 0,663
Sm15	0,864	0,052	0,765 - 0,932
SEA ~ Sm15			
Diferença entre áreas			0,316
Desvio padrão (DP)			0,107
Intervalo de confiança a 95% (IC 95%)			0,107 - 0,525
Nível de significância			P = 0,003

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Características estatísticas estabelecidas pelo programa MedClac para a utilização do polipeptídeo recombinante Sm15e do SEA como antígenos para o ELISA. AAC –Área abaixo da curva; DP – Desvio padrão; IC 95%– intervalo de confiança a 95%.

Gráfico 4 – Sobreposição das curvas ROC estabelecidas para os ELISA utilizando os antígenos Sm15 e SEA

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gráfico de sobreposição das curvas ROC calculadas pelo MedClac para os antígenos Sm15 e SEA, sendo a linha pontilhada em vermelho a curva do antígeno Sm15 (AUC = 0,864) e a linha azul correspondente ao SEA (AUC = 0,548).

7 DISCUSSÃO

Através da análise da população incluída neste estudo, verificamos que, embora as a porcentagem de mulheres tenham diminuído com relação a estudos prévios, elas continuam sendo a maioria entre os pacientes com esquistossomose totalizando 54,7% dos incluídos neste estudo (GAZZINELLI *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2013; FIGUEIREDO, 2014), quando estratificamos os pacientes entre agudos e crônicos, percebemos porcentagens de 75 e 52,2% respectivamente, demonstrando que as mulheres estão se infectando mais que os homens. Alguns estudos apontam causas que tornam as mulheres um grupo mais susceptível a infecção esquistossomótica, a principal é que as mulheres permanecem mais tempo em contato com a água, por terem mais atividades realizadas em rios como lavar roupa, pratos, dar banho em crianças e até cuidar dos filhos em momentos de lazer (GAZZINELLI *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2014). Com relação à idade dos pacientes, em nossa análise verificamos uma variação de 19 a 86 anos, apresentando medianas de 31,5 anos, para o grupo agudo, e de 58 para o grupo crônico.

Ao avaliar o grau de escolaridade, a renda familiar e a localização da residência, provável local de infecção dos indivíduos, constatamos que a grande maioria dos pacientes incluídos neste estudo não possuía escolaridade ou a escolaridade era incompleta no ensino fundamental (74,7%) e 81,3% dos indivíduos esquistossomóticos possuem uma renda familiar entre 1 a 2 salários mínimos. Além disso, 88% dos indivíduos residem na zona da mata pernambucana, estes dados corroboram com vários estudos socioeconômicos realizados que definem como grupo mais susceptível a infecção esquistossomótica indivíduos com menos renda familiar, baixo nível de escolaridade e que vivem no interior (BARBOSA *et al.*, 1998; DOMINGUES *et al.*, 2013; XIMENES *et al.*, 2003; GAZZINELLI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011).

Os últimos indicadores socioeconômicos avaliados neste estudo foram a presença de saneamento básico nas residências dos pacientes esquistossomóticos, a realização de tratamento e o tempo desde o último contato com coleções hídricas. Verificamos que 50,7% dos nossos pacientes não haviam realizado nenhum tipo de tratamento esquistomicida, discordando de dados prévios encontrados por nosso grupo onde 90,54% dos pacientes havia realizado tratamento prévio para a doença (FIGUEIREDO, 2014). Acreditamos que este aumento no número de indivíduos que nunca realizaram tratamento para a doença, seja consequência da diminuição das políticas de tratamento em massa que eram promovidos pelo governo, através de programa de controle, e da falta de medida socioeducativas que promovam a conscientização das populações mais susceptíveis a buscar o tratamento. Em

nosso estudo, a porcentagem de pacientes que evitou o contato com coleções hídricas há no mínimo 10 anos foi de 60%, corroborando com estudos prévios que encontraram taxas de 60,8% (FIGUEIREDO, 2014). O elevado número de pacientes que evita este contato, nos leva a crer que depois de esclarecido com relação aos perigos da doença, os mesmos tendem a seguir as orientações médicas, elevar sua cautela e evitar a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, isso explica o fato de indivíduos com maior conhecimento e maior grau de escolaridade são menos susceptíveis a infecção (DOMINGUES *et al.*, 2013; GAZZINELLI *et al.*, 2006).

Apesar de estudos indicarem que melhoras nas condições de saneamento básico, causariam uma diminuição na prevalência da doença (BARBOSA *et al.*, 1998). Neste estudo, encontramos uma alta porcentagem de residências que possuem saneamento básico (74,7%), corroborando assim, com os estudos realizados por Ximenes *et al.* (2003), Silva *et al.* (2011) e Domingues *et al.* (2013) e Figueiredo *et al.* (2014). Assim como outros estudos apontam, acreditamos que a intensificação de políticas de educação sanitária é a chave para que ocorra uma diminuição na prevalência da esquistossomose (DOMINGUES *et al.*, 2013).

Muitos estudos epidemiológicos auxiliam e embasam a aplicação de programas de controle da esquistossomose, pois, os mesmos além de identificar zonas endêmicas e novos focos da doença, através do diagnóstico de uma população, também podem avaliar a eficácia do tratamento em massa no qual certa área foi submetida. A OMS recomenda a utilização do esfregaço fecal de Kato-Katz (teste coprológico) por ser um exame simples, rápido, de fácil execução, baixo custo (\pm U\$ 2/teste) e independente de grande infraestrutura laboratorial (GONÇALVES *et al.*, 2005; KATZ *et al.*, 1972; WHO, 1985; KATZ; ALMEIDA, 2003; SOUZA *et al.*, 2007).

Porém, uma grande limitação encontrada nos testes coprológicos é a dependência direta que existe entre a sua sensibilidade e a quantidade de fezes examinada por teste (ENGELS *et al.*, 1996; KONGS *et al.*, 2001). Esta dependência fragiliza a confiabilidade dos resultados negativos, conseqüentemente, os mesmos não são capazes de excluir a possibilidade de infecção, tornando-se assim pouco eficientes (DEVLAS; GRYSSELS, 1992; NOYA *et al.*, 1999; RABELLO, 1997; DOENHOFF *et al.*, 2004). Embora um crescimento considerável na sensibilidade desta técnica seja obtido através do aumento no número de lâminas examinadas, tal abordagem aumentaria não só o custo de estudos epidemiológicos, como também a complexidade de execução do teste, limitando as vantagens operacionais deste método em trabalhos de campo de grande escala (DEVLAS; GRYSSELS, 1992).

Atualmente, os testes imunológicos são uma ótima alternativa diagnóstica para a esquistossomose, pois, são capazes de suprir as limitações presentes nos métodos coprológicos. Isto porque, no geral, os métodos imunológicos possuem uma boa sensibilidade apresentando taxas muito baixas de falso-positivos. Além disso, estudos indicam que níveis de antígenos circulantes geralmente estão correlacionados com o número de ovos excretados, possibilitando assim a quantificação indireta da carga parasitária (VAN LIESHOUT, *et al*, 1995). Então, visando gerar alternativas de diagnóstico para inquéritos epidemiológicos, muitos grupos de pesquisa esforçam-se na tentativa de desenvolver testes imunodiagnósticos que sejam satisfatórios (DE JONGE. *et al*, 1988; DEELDER *et al*, 1989; DOENHOFF, M. J. *et al*, 2004; CARVALHO, *et al* 2011). Porém, apesar de inúmeras técnicas terem sido desenvolvidas, poucas têm alcançado as etapas de validação (GOMES *et al.*, 2014).

Em suma, mesmo possuindo elevadas taxas de sensibilidade, os métodos de imunodiagnóstico atuais apresentam, na sua maioria, especificidades muito aquém do que se espera de um método diagnóstico por apresentarem reações cruzadas com outros helmintos, protozoários e até bactérias como ocorre com a utilização dos extratos brutos (MOTT; DIXON, 1982; SMITHERS; DOENHOFF, 1982; MONTENEGRO, 1992; RABELLO, 1997; WU, 2002; CARVALHO, *et al* 2011; GOMES *et al.*, 2014). Assim, métodos que utilizem antígenos proteicos recombinantes representam uma promissora linha de pesquisa, podendo suprir limitações que atualmente impedem a utilização do imunodiagnóstico em inquéritos epidemiológicos (CARVALHO, *et al* 2011; GOMES *et al.*, 2014).

Baseado num extenso e trabalhoso estudo de triagem proteica para o desenvolvimento de abordagens imunoprofiláticas e diagnósticas, realizado previamente por nosso grupo de pesquisa (ABATH *et al.*, 1993; 1994), neste trabalho, foi produzido, através da tecnologia de DNA recombinante utilizando *Escherichia coli*, o polipeptídeo Sm15. Dentre as várias proteínas e polipeptídeos que se apresentavam imunogênicos (Sm23, Sm45) escolhemos trabalhar com o polipeptídeo Sm15, pois, este apresentou uma a melhor reatividade quando testado em etapas de experimentação animal (ABATH *et al.*, 1997). Além disso, baseado no fato de que regiões repetitivas, no geral, são mais imunogênicas e no fato do polipeptídeo em questão possuir estas regiões, o Sm15 em nossa avaliação prévia apresentou um potencial diagnóstico mais elevado que os demais polipeptídeos (ABATH *et al.*, 1993; 1997).

Este trabalho teve o intuito de avaliar o potencial diagnóstico do polipeptídeo Sm15, verificando sua reatividade frente aos soros de indivíduos infectados com o *S. mansoni* e ainda, se este polipeptídeo recombinante seria capaz de diferenciar pacientes com formas clínicas agudas e crônicas da esquistossomose.

O polipeptídeo Sm15 foi originalmente identificado a partir do isolamento através de bibliotecas de cDNAs (A70 e A180), o polipeptídeo compõe o sincício do *Schistosoma mansoni* e está presente em vermes adultos a partir duas semanas de vida (ABATH *et al.*, 1993; 1994). Através de análises prévias de bioinformática Abath *et al.* identificaram que a sequência do polipeptídeo Sm15 não possuía homologia com outras proteínas presentes em bancos de dados, indicando que este polipeptídeo é extremamente específico para a espécie *S. mansoni* (ABATH *et al.*, 1993; 1997). Porém, novas análises de alinhamento de sequências realizadas no atual estudo indicam que esta proteína além de ser bem conservada entre cepas diferentes do *S. mansoni*, também se encontra conservada entre outras espécies do gênero *Schistosoma*, tal análise explica o motivo do anticorpo específico anti-Sm15 ter reconhecido previamente um polipeptídeo no extrato de vermes adultos do *S. japonicum* em trabalhos prévios (ABATH *et al.*, 1994).

Com relação ao tamanho do polipeptídeo Sm15 (30 Kda), que neste trabalho se apresentou maior do que esperado (15,9 Kda), levantamos duas hipóteses para a ocorrência desse fato. A primeira é que, por se tratar de um polipeptídeo recombinante gerado a partir de uma *E. coli*, sabendo que o sistema procariótico não possui ferramentas que possibilitem um alto processamento pós-transcricional e que este polipeptídeo de 15 Kda necessita de tal processamento, visto que sua proteína precursora possui aproximadamente 117 Kda. Acreditamos que de alguma forma a falta dessa maquinaria de modificações pós-transcripcionais afetou o comportamento do polipeptídeo na corrida eletroforética, mesmo em condições desnaturantes. A segunda hipótese é de que o comportamento “anormal” deste polipeptídeo recombinante seja devido a sua composição aminoacídica que é extremamente ácida, possuindo um ponto isoelétrico num pH de 4,18 (ABATH *et al.*, 1993; 1997).

Ao realizar o ELISA com SEA obtivemos sensibilidade e especificidade de 70,15% e 62,50% respectivamente, corroborando assim com resultados encontrados em estudos prévios em que os valores de sensibilidade e especificidade semelhantes (BECK *et al.*, 2007, DAWSON *et al.*, 2013). Entretanto, a sensibilidade e especificidade encontradas no nosso estudo mostraram-se discordantes de alguns estudos encontrados na literatura que apresentavam maiores valores como os de Liping *et al* (1999) e Lei *et al* (2011). Acreditamos que nestes estudos, ao realizar ELISA utilizando SEA para detectar outra espécie do gênero *Schistosoma*, o *S. Japonicum*, os valores de sensibilidade podem ter sofrido variação.

No presente estudo, ao utilizar o SEA como antígeno, não foi possível estabelecer a diferenciação dos pacientes entre as formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose. Tais resultados divergem de estudos encontrados na literatura, onde este extrato foi capaz de

realizar esta diferenciação (RABELLO *et al.*, 1995; VALLI *et al.*, 1997; BECK *et al.*, 2007). Alguns estudos utilizando a fração antigênica CEF6, componente do extrato bruto SEA, indicam que testes sorológicos realizados com este antígeno tendem a apresentar melhores resultados de sensibilidade, controle de cura e maior redução no número de reações cruzadas (TURNER *et al.*, 2004; SORGHIO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2014).

Testes sorológicos baseados em antígenos recombinantes constituem um método especialmente útil para o diagnóstico da esquistossomose, podendo suprir limitações encontradas nas altas taxas de reações cruzadas que atualmente impedem a utilização do imunodiagnóstico (SORGHIO *et al.*, 2005, ALARCON DE NOYA *et al.*, 2007; CARVALHO, G. B. F. *et al.* 2011; GOMES *et al.*, 2014).

Assim, realizamos testes através da plataforma de ELISA utilizando como antígeno o polipeptídeo recombinante Sm15. Os resultados de sensibilidade e especificidade obtidos foram de 76,12% e 87,50% respectivamente, contrastando de estudos prévios que utilizaram outros antígenos também inéditos (*Sm*200 Kda, Urine-CCA) que apresentaram taxas menores de sensibilidade quando comparadas as deste estudo (ERKO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014).

Apesar de ter apresentado valores de sensibilidade um pouco menor, quando comparados a testes sorológicos com antígenos bem estudados (CEF6, MAS1, SEA), as taxas de especificidade apresentaram-se bastante altas para um primeiro teste o que reforça o potencial diagnóstico deste polipeptídeo recombinante (TURNER *et al.*, 2004; SORGHIO *et al.*, 2005, ALARCON DE NOYA *et al.*, 2007; GRENFELL *et al.*, 2014). Além disso, diferentemente do nosso estudo alguns dos estudos supracitados realizaram testes em indivíduos que se apresentavam positivos para o teste parasitológico e tal fato poderia justificar a maior sensibilidade obtida nesses casos, pois, os pacientes estudados apresentavam uma maior carga parasitária representando assim um viés nos estudos.

Ao realizar a comparação entre os ELISA utilizando os antígenos Sm15 e SEA, além de termos obtido melhores resultados de sensibilidade e especificidade com o polipeptídeo recombinante Sm15, este polipeptídeo demonstrou ser muito mais reativo frente a soros de pacientes esquistossomóticos do que o antígeno SEA. Além disso, observamos que este polipeptídeo apresentou a capacidade de diferenciar os pacientes esquistossomóticos entre as formas clínicas aguda e crônica da doença. Estes resultados, além ratificar o potencial diagnóstico deste polipeptídeo, demonstra a importância da sua utilização no tratamento, pois segundo Beck *et al.* (2007) a diferenciação de formas aguda e crônica é de extrema importância para a escolha do procedimento a ser adotado no tratamento da infecção, visto

que as taxas de cura flutuam a depender da carga parasitária e dos esquemas posológicos utilizados no tratamento (CUNHA, 1992).

Visto que o controle de cura da esquistossomose atualmente é realizado ao longo de 6 meses, sendo cinco kato-katz mensais e uma biópsia retal no sexto mês e uma vez que o Sm15 só é encontrado em vermes adultos com ao menos duas semanas de vida. Com a utilização do polipeptídeo Sm15, ainda existe a possibilidade do desenvolvimento de um teste baseado na captura de antígenos que seja mais simples, menos invasivo e que apresente respostas melhores e mais rápidas com relação ao controle de cura da doença (ABATH *et al.*, 1994; VITORINO *et al.*, 2012).

Por fim, os resultados encontrados neste estudo sugerem que o polipeptídeo recombinante Sm15 é uma ferramenta antigênica para o uso no diagnóstico da esquistossomose, pois este antígeno apresentou boas taxas de sensibilidade e especificidade. Além disso, o polipeptídeo demonstrou um alto grau discriminatório entre pacientes com as formas aguda e crônica da esquistossomose.

No entanto, fazem-se necessários novos estudos utilizando o polipeptídeo recombinante Sm15 como antígeno, visando melhorar sua sensibilidade e especificidade. Em face as tecnologias existentes atualmente, uma infinita gama de aplicações que podem ser empregadas para gerar uma melhora nos resultados obtidos, como por exemplo a utilização do polipeptídeo fusionado a outros polipeptídeos que sejam igualmente específicos numa única proteína quimérica, a utilização do polipeptídeo recombinantes Sm15 adicionado a regiões repetitivas encontradas no seu precursor proteico ou sua utilização através de Multiple Antigen Peptides (MAP) forçando uma apresentação ramificada (KOWALCZYK *et al.*, 2010). E ainda a utilização em plataformas sorológicas diferentes como, por exemplo, Luminex ou citometria de fluxo que apresentam maior sensibilidade quando comparadas ao ELISA.

Assim, poderemos desenvolver um método de elevada acurácia que irá superar as lacunas existentes em relação aos testes parasitológicos e aos testes sorológicos atualmente disponíveis que possuem baixa sensibilidade e especificidade e que apresentam reações cruzadas com outras helmintoses, especialmente em áreas endêmicas, onde frequentemente a população encontra-se poliparasitada. E com isso, estaremos contribuindo com o diagnóstico precoce da esquistossomose, auxiliando nos inquéritos epidemiológicos, implantação de políticas públicas visando o tratamento da população e impedindo a evolução da doença para as formas clínicas de maior gravidade.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho verificamos que, o polipeptídeo recombinante Sm15 apresentou reatividade frente a soros de pacientes esquistossomóticos, sendo mais reativo do que o extrato bruto SEA ($P=0.00439$). Demonstrando, maiores valores de sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva ROC ($P=0,003$), sendo 76,12%; 87,50% e 0,864 respectivamente o teste utilizando com o Sm15 apresentou melhor desempenho quando comparado ao teste utilizando o SEA com antígeno. Além disso, o polipeptídeo recombinante Sm15, diferentemente do SEA, foi capaz de diferenciar pacientes esquistossomóticos quanto à forma clínica apresentada, aguda ou crônica ($P=0.00079$). Os resultados obtidos neste estudo além de ratificar o potencial diagnóstico apresentado pelo polipeptídeo Sm15, indicaram que o mesmo após a realização de novos estudos será capaz de gerar uma alternativa diagnóstica de elevada acurácia que poderá suprir as lacunas existentes com relação aos testes parasitológicos e sorológicos atualmente disponíveis. Possibilitando assim o diagnóstico precoce da esquistossomose, impedindo a evolução da doença para as formas clínicas de maior gravidade e a realização inquéritos epidemiológicos mais acurados.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.C *et al.* Expression of recombinant antigens in *Escherichia coli*: application on immunochemical studies of *Schistosoma mansoni* tegumental antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 637 – 641, Sep./Out. 1997.
- ABATH, F.G.C. Partial characterization and kinetics of expression of sm15, a *Schistosoma mansoni* tegumental antigen. Parasitology Research. Berlin, v. 80, p. 64-69, 1994 .
- ABATH, F.G.C. Structure of the gene encoding a putative *Schistosoma mansoni* tegumental antigen precursor. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 26, n. 1, Mar. 1993 .
- ALARCÓN DE NOYA B, *et al.* Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. Acta Trop. Basileia. v. 103, n. 1, p. 41-9, Jul, 2007.
- AMARAL R.S., *et al.* An analysis of the impact of Schistosomiasis Control Programme in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 101, p.79-85, 2006.
- ANDRADE, ZA. Esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisa. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília, v. 35 n. 5, p. 509 – 513, 2002.
- ARAUJO, N. *et al.* Association of oxaminiquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 781-785, 2008.
- BARBOSA C. S., BARBOSA F. S. Padrão epidemiológico da esquistossomose em comunidade de pequenos produtores rurais de Pernambuco, Brasil. Cad Saude Publica. Rio de Janeiro. v. 14, p. 129-137, 1998.
- BECK *et al.* Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. Acta Tropica. Basileia. v. 108, p. 229–233, 2008.
- BERGWERFF, A.A. *et al.* The immunologically reactive part of immunopurified circulating anodic antigen from *Schistosoma mansoni* is a threonine-linked polysaccharide consisting of (6)-(beta-DGlcP-A-(1 3))-beta-D-GlcPNAc-(1 repeating units. J. Biol. Chem. Baltimore. v. 269, p. 31510–31517, 1994.
- BERHE N, *et al.* Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. Basileia. v. 92, p. 205-212, 2004.
- BICHLER, K.H. Schistosomiasis: a critical review. Current Opinion in Urology, Philadelphia. v. 11, p. 97 – 101, 2001.
- BINA, J.C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília. v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.

BRANDT, *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. Revista do colégio brasileiro de cirurgiões. Rio de Janeiro. v.10, n. 5, p. 333-337, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Controle da Esquistossomose: Diretrizes Técnicas. 2 ed. Brasília, 70p, 1998.

BRASIL. Secretaria de vigilância de saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica 10 ed.. 2012.

BRASIL. Secretaria de vigilância de saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica 2005. 6 ed. Brasília, 2005b. 816p.

BRASIL. Secretaria de vigilância de saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 7 ed., p. 840, 2009.

BRASIL. Secretaria de vigilância de saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed, 2010.

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

CARNEIRO, T.R. *et al.* A conventional polymerase chain reaction-based method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 108, n. 8, Dec, 2013.

CARVALHO GB, *et al.* Evaluation of the use of C-terminal part of the Schistosoma mansoni 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. Exp Parasitol. Nova Iorque. v. 139, p. 24-32, Apr, 2014.

CARVALHO OS, NUNES IM, CALDEIRA RL. First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 93 p. 39-40, 1998.

CARVALHO, G. B. F. *et al.* Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. Instituto de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2011.

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

COURA J. R. *et al.* Morbidade da esquistossomose mansoni no Brasil, estudo de 4.652 casos observados no Rio de Janeiro de 1960 a 1976. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 77, p. 69-88, 1982.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Áreas. Memorial Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n.1, p.13-19, 2004.

COUTINHO, A.D.; DOMINGUES, A.L.C. Esquistossomose mansoni. In: Dani R, Castro LP. Gastroenterologia Clínica, 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988 p. 1361 - 1386.

CUNHA, ALOISIO SALES DA. Schistosomiasis mansoni: drug therapeutic. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 87, supl. 4, 1992 .

DAWSON E. M., *et al.* Intestinal Schistosomiasis in pre school-aged children of Lake Albert, Uganda: diagnostic accuracy of a rapid test for detection of anti-schistosome antibodies. Trans R Soc Trop Med Hyg. Londres. v. 107, n.10, p. 639-47, Out, 2013.

DE JONGE, N. *et al.* Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Londres. v. 82, p. 591–594, 1988.

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

DEELDER, A.M. *et al.* Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. Baltimore. v. 40, p. 268–272, 1989.

DEVLAS, S.J.; GRYSSELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalence. Parasitol Today. Cambridge. v. 8, n. 1, p. 274-277, 1992.

DIAS, L.C.S.; GLASSER, C.M.; MARÇAL Jr, O.; BONESSO, P. I. Epidemiologia da esquistossomose mansônica na área de baixa endemicidade. Cad Saúde Pública. Rio de Janeiro. v. 10, n. 2, p. 254 – 260, 1994.

DOENHOFF MJ, BUTTERWORTH AE, HAYES RJ, STURROCK RF, OUMA JH, KOECH D, *et al.* Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Londres. v. 87, p. 42-48, 1993.

DOENHOFF, MJ.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?. Trends in parasitology, Elsevier. Oxford. v. 20 N. 1, 2004.

DOMINGUES, A. L. C. Diagnóstico por imagem. In: CARVALHO, O. S (Org.). Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 929-961, 2008.

DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). Esquistossomose mansônica. Recife: Ed. Universitária da UFPE. 5, p. 91-105, 1994.

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

DOMINGUES, A. L. C *et al.* Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 46, n. 4, Aug. 2013 .

EL-MORSHEDY H, KINOSIEN B, BARAKAT R, OMER E, KHAMIS N, DEELDER AM, *et al.* Circulating anodic antigen for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Egyptian patients. Am J Trop Med Hyg. Baltimore. v. 54, p. 149-153, 1996.

ENGELS D, *et al.* Intraspecimen fecal egg count variation in *Schistosoma mansoni* infection. Am J Trop Med Hyg. Baltimore. v. 57, p. 571-577, 1997.

ENGELS D, SINZINKAYO E, GRYSEELS B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. Am J Trop Med Hyg. v. 54, p. 319-24, 1996.

ENK MJ, LIMA AC, DRUMMOND SC, SCHALL VT, COELHO PM. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. Acta Trop. Basileia. v. 108, p. 222-228, 2008.

ENK, M. J.; SILVA, G. O.; RODRIGUES, N. B. Diagnostic Accuracy and Applicability of a PCR System for the Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Urine Samples from an Endemic Area. Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil, e Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2012.

ERKO B, *et al.* Evaluation of urine-circulating cathodic antigen (Urine-CCA) cassette test for the detection of *Schistosoma mansoni* infection in areas of moderate prevalence in Ethiopia. Trop Med Int Health. Oxford. v. 18, n. 8, p. 1029-1035, 2013.

ESPIRITO-SANTO MCC, ALVARADO-MORA MV, PINTO PLS, CARRILHO FJ, PINHO JRR, GRYSCHER RCB. Two sequential PCR amplifications for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. Rev Inst Med Trop. Assunção. v. 54, n. 5, 2012.

FATAAR S, BASSIONY H, SATYANATH S, VASSILEVA J, HANNA RM. Characteristic sonographic features of *Schistosomal* periportal fibrosis. AJR Am J Roentgenol. Leesburg. v.143, p. 69-71, 1984.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v.36, n. 1, p. 67-74, 2007.

FIGUEIREDO, A. L. C. Esquistossomose mansônica humana: avaliação do receptor antagonista de IL-13 (IL-13 α 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.

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. Basileia, v. 99, p. 260-271, 2006.

GAZZINELLI, M. F. *et al.* A interdição da doença: uma construção cultural da esquistossomose em área endêmica, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro: 18(6), p. 1629 – 1638, 2002.

GENTILE R, GONÇALVES MML, NETO SFC, COSTA MM, PERALTA RHS, PERALTA JM. Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. Vet Parasitol. Amsterdam. v. 180. p. 243-249, 2011.

GHANDOUR AM, TRICKER K, DOENHOFF MJ, AL-ROBAI AA, BANAJA AA. An enzyme-linked immunosorbent assay using *Schistosoma mansoni* purified egg antigen for the diagnosis of schistosomiasis in Saudi Arabia. Trans R Soc Trop Med Hyg. Londres. v. 91, p. 287-289, 1997.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we?. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 47, n. 1, Feb. 2014 .

GONÇALVES, M.M.L.; BARRETO, M.M.G; MALDONADO JR, A.; MAIONE, V.R.; REY, L.; SOARES, M.S. Fatores sócio-culturais e éticos relacionados com os processos de diagnóstico da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. v. 21, n. 1, p. 92-100, 2005.

GRANT, A.V *et al.* Functional Polymorphisms in IL13 Are Protective against High *Schistosoma mansoni* Infection Intensity in a Brazilian Population. Plos ONE. São Francisco. v. 7, p. 1-6, 2012.

GREENBERG RM. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? Int Parasitol. Nova Iorque. v. 35, n. 9, 2005.

GREENBERG, R.M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. Parasitology. Londres. v. 3, p. 1-13, 2013.

GRENFELL RF, *et al.* Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. PLoS One. São Francisco. v. 31, Jan, 2014.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. Institute of Tropical Medicine, Belgium. Infect Dis Clin North Am. Filadélfia. v. 26, n.2, p. 383-97. Jun 2012.

HAGGAG SH, ABDULLAH SM. Molecular diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in human serum and feces by using polymerase chain reaction. Life Sci J. Amsterdam. v. 8: 398-404, 2011.

JORDAN, P. & WERBE, G. Human Schistosomiasis. Springfield, Illinois. p. 105–115. 1969.

KANAMURA HY, HOSHINO-SHIMIZU S, CAMARGO ME, SILVA LC. Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. Am J Trop Med Hyg. Baltimore. v. 28, p. 242-248, 1979.

KATO-HAYASHI N, KIRINOKI M, IWAMURA Y, KANAZAW T, KITIKOON V, MATSUDA H. Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction. Exp Parasitol. Nova Irque. v. 124, p. 325-329, 2010.

KATZ N. Schistosomiasis vaccines: the need for more research before clinical trials. Parasitol Today. Londres. v. 15, p. 65-66, 1999.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, Barriga d'água. Cienc. Cult., São Paulo. v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KATZ, N.; CHAVES, A.. PELLEGRINO, J. Simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 14, p. 397-400, 1972.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo. v. 33, n. 3, p. 303 – 308, 2000.

KONGS A, MARKS G, VERLÉ P, VAN DER STUYFT P. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. Trop Med Int Health, Oxford. v. 6, p. 163-169, 2001.

KOWALCZYK W, *et al.* Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations. J Pept Sci. Chichester. v.17, n. 4, p. 247-51, abr 2010.

LAMBERTUCCI JR, BARRAVIERA B. Esquistossomose mansônica. Estudo Clínico. JBM J Bras Med, Rio de Janeiro. v.67, p.59-100, 1994.

LEI JH, *et al.* Evaluation of an IgY-based immunomagnetic enzyme-linked immunosorbent assay system for detection of circulating *Schistosoma japonicum* antigen in serum samples from patients in China. Am J Trop Med Hyg, Baltimore. v.85, p. 1054–1059, 2011.

LENGELER, C.; UTZINGER, J.; TANNER. Questionares for rapid screening of schistosomiasis in sub-Saharan, Africa. Bulletin of the World Health Organization, v. 80, p. 235-242, 2002.

LIMA *et al.* Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil): II. Intermediate hosts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 97, supl. 1, Oct. 2002 .

LIN DD, *et al.* Routine Kato-Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: a case study in an endemic area of the People's Republic of China. Parasitol Int, Amsterdam. v. 57, p. 281-286, 2008.

LIPPING C *et al.* The serological differentiation of acute and chronic Schistosomiasis japonica using IgA antibody to egg antigen. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 91(6): 751-754. 1996.

MATOS, A.C.A.; PEREIRA, G.C.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; KUSEL, J.R.; COELHO, P.M.Z. Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs

on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica, basileia. v. 102, p. 84-91, 2007.

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

MELO, A.L.; COELHO, P. M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P. (Org.). Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 193-212.

MONTENEGRO, SILVIA MARIA LUCENA. Immunodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 87, supl. 4, 1992 .

MOTT KE, DIXON H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. Bull World Health Organ, Genebra. v. 60, p. 729-753, 1982.

MOURA, A.C. M. *et al.* Atualização de mapa de drenagem como subsídio para a montagem do SIG para a análise da distribuição da esquistossomose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2005, Goiania. Anais. Goiania, v. 16, p. 3551-3558, 2005.

NETO O.B.L.; GOMES, E.C.S.; JUNIOR, F.J.M.O.; ANDRADE, R.; REIS, D.L.; SOUZA-SANTOS, R.; BOCANEIRA, S.; BARBOSA, C.S. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro. v. 29, n. 2, 2013.

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

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. Química Nova, São Paulo. v. 22 (1), p. 5-10,1999.

NOYA B.A.; BALZAN, C.; ARTEGA, C.; CESARI, I., NOYA, O. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 139-146, 1999.

OKABE, K. and TANAKA, T. Urine precipitation reaction for schistosomiasis Japonica. Kurume Med. J, Kurume. v. 8, p. 24-29, 1961.

OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, J. F. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica nos Bairros Novo Horizonte e Campo Limpo, Feira de Santana, Bahia. Sittentibus Ciências Biológicas. v. 2, n. 1, p. 69 – 72, 2002.

OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidinônicos. Acta Farmacêutica Bonaerense, Buenos aires. v. 23 (3), p. 343-348, 2004.

OLLIARO, P.L. *et al.* 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 Neglected Tropical Diseases, São Francisco. v. 5, n.6, 2011.

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

PINTO-SILVA RA, ABRANTES WL, ANTUNES CM, LAMBERTUCCI JR. Sonographic features of portal hypertension in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop. São Paulo, v.36, p.355-361, 1994.

PONTES LA, OLIVEIRA MC, KATZ N, DIAS-NETO E, RABELLO A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg, Londres. v. 68, p. 652-656, 2003.

PONTES L.A., DIAS-NETO E, RABELLO A. PCR detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human fecal and serum samples. Am J Trop Med Hyg, Londres. v. 66, p. 157–162, 2002.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M.; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. Epidemiologia serviço saúde, Rio de Janeiro. v.17, n.3, p. 163-175, 2008.

PRATA A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI R & FOCACCIA R (Ed). Tratado de Infectologia. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2002. v.2, cap.107, p.1374-1392.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 92, n.5, p. 669-676, 1997.

RABELLO, A., PONTES, L.A, DIAS-NETO, E. Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma* infection: the detection of parasite DNA. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 97, 171–172, 2002.

REITHINGER R, DUJARDIN JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol, Washington. v. 45, p. 21-25, 2007.

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.

REY, L. Parasitologia Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: Parasitologia. 3. ed. Riode Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856 p. p. 413-425.

RICHTER J, DOMINGUES ALC, BARATA CH, PRATA AR, LAMBERTUCCI JR. Report on the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v.96, p.151-156, 2001.

ROSS AG, LI Y, SLEIGH AC, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. Faecal egg aggregation in humans infected with *Schistosoma japonicum* in China. Acta Trop, Basileia. v. 70, p. 205-210, 1998.

SAMBROOK J, FRITSCHI EF AND MANIATIS T Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque. 1989.

SANDOVAL N, *et al.* A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. Parasitology, Londres. v. 133, p. 581-587, 2006.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE (Pernambuco). Boletim epidemiológico de Esquistossomose. Recife: Secretaria Estadual de Saúde; 2008.

SILVA PCV, DOMINGUES ALC. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no estado de Pernambuco, Brasil. Epidemiol Serv Saude, Brasília. v. 20. P. 327-336, 2011.

SILVA, C. M. M. *et al.* Internaional symposium on Schistosomiasis, 2011.

SMITHERS SR, DOENHOFF MJ. Schistosomiasis. In S Cohen, KS Warren (eds.), Immunology of parasitic diseases, Blackwell, Oxford, p. 527, 1982.

SORGHO H, BAHGAT M, PODA JN, SONG W, KIRSTEN C, DOENHOFF MJ, *et al.* Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. Acta Trop, Basileia. v. 93. P. 169-180, 2005.

SOUZA, D. *et al.* Vigilância Epidemiológica e controle da esquistossomose: normas e instruções. 1. ed. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, 2007.

SOUZA, D.; *et al.* Vigilância Epidemiológica e controle da esquistossomose: normas e instruções. 2009. 1. ed. São Paulo: Centro de Vigilância 99

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; JUNIOR, F.C.F.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Revista brasileira clínica médica, São Paulo. v. 9, n.4, p. 300-307, 2011.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. The Lancet Infectious Diseases, United States, v. 6, n. 7, p. 411-425, jul. 2006.

SULBARAN GS, BALLEEN DE, BERMUDEZ H, LORENZO M, NOYA O, CESARI IM. Detection of the Sm31 antigen in sera of *Schistosoma mansoni* infected patients from a low endemic area. Parasite Immunol, Oxford. v. 32, p. 20-28, 2010.

TANABRE, M.; GONÇALVES, J.F.; GONÇALVES, F.J.; TATENO, S.; TAKEUCHI, T. Occurrence of community with a high morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection

intensity in north-east of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, Londres. v. 91, p. 144-149, 1997.

TEN HOVE RJ, VERWEIJ JJ, VEREECKEN K, POLMAN K, DIEYE L, VAN LIESHOUT L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg, Londres. v. 102, p. 179-185, 2008.

TURNER P1 *et al.* Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. J Clin Pathol, Londres. v. 57, n. 11, p. 1193-1196, 2004.

UTZINGER J, BOOTH M, N'GORAN EK, MÜLLER I, TANNER M, LENGELER C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. Parasitology, Londres. v. 122, p. 537-544, 2001.

UTZINGER, J.; SHUSHUA, X.; KEISER, J.; MINGGAN, C.; JIANG, Z.; TANNER, M. Current Progress in the Development and Use of Artemether for Chemoprophylaxis of Major Human Schistosome Parasites. Current Medicinal Chemistry, Schiphol. v.8, 2001, p. 1841-1859.

VALLI LCP *et al.* Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of an serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore. v. 57. n. 3, p. 358-362, 1997.

VAN DAM, G.J. *et al.* The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis-X as a repeating unit. Eur. J. Biochem, Berlin. v. 225, p. 467-482, 1994.

VAN DER WERF, M. J. *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. Acta Tropica, Basileia, v. 86, n. 2-3, p. 125-139, may 2003.

VAN LIESHOUT, L. *et al.* Analysis of worm burden variation in human *Schistosoma mansoni* infections by determination of serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. J. Infect. Dis, Chicago. v. 172, p. 1336-1342, 1995.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd, São Paulo. v. 10, n. 1, jan.-fev. 2012.

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

WERKHÄUSER, R. P. *et al.* Mapping of the N terminus of the *Schistosoma mansoni* tegumental antigen Sm15 to its predicted precursor protein. The Australian Society of parasitology, 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, Genebra, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> acessado em: 11/03/2014.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis. Tech Rep Series, Genebra. n. 728, p. 99, 1985.

WU, *et al.*, A historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in China. Acta Tropica, Basileia. v. 82, p. 193-198, 2002.

XIMENES R, SOUTHGATE B, SMITH PG, GUIMARÃES NETO L. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in an urban area in the Northeast of Brazil. Rev Panam Salud Publica, Washington. v. 14, n. 6, p. 409-21, 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-13R α 2) 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 (3ml) **em tubo com heparina e 3ml em tubo seco**, 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.

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

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: Grau de fibrose
Niamey:
Média fibrose
Baço longitudinal
Veia Porta

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br



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 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

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

