

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

**ANA VIRGÍNIA MATOS SÁ BARRETO**

**ESTUDO DE BIOMARCADORES PARA MORBIDADE E ACOMPANHAMENTO  
PÓS-TERAPÊUTICO EM PACIENTES COM ESQUISSOMOSE MANSONI**

**RECIFE**

**2018**

**ANA VIRGÍNIA MATOS SÁ BARRETO**

**ESTUDO DE BIOMARCADORES PARA MORBIDADE E ACOMPANHAMENTO  
PÓS-TERAPÊUTICO EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
em Biociências e Biotecnologia em Saúde  
do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Clarice N. Lins de Moraes

Coorientadoras: Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro

Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues

**RECIFE**

**2018**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães**

---

B273e Barreto, Ana Virgínia Matos Sá  
Estudo de biomarcadores para morbidade e acompanhamento pós-terapêutico em pacientes com Esquistossomose mansoni / Ana Virgínia Matos Sá Barreto. - Recife: [s.n.], 2018.  
87 p. : il., graf., tab.; 30 cm

Tese (Doutorado em saúde pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientadora: Dra. Clarice N. Lins de Moraes; co-orientadoras: Sílvia Maria Lucena Montenegro, Ana Lúcia Coutinho Domingues.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Fibrose. 3. Biomarcadores. 4. Fosfatase alcalina. 5. Plaquetas. 6. MicroRNAs. I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de Gomes. II. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. III. Ana Lúcia Coutinho. IV. Título.

CDU 614.39(81)

---

**ANA VIRGÍNIA MATOS SÁ BARRETO**

**ESTUDO DE BIOMARCADORES PARA MORBIDADE E ACOMPANHAMENTO  
PÓS-TERAPÊUTICO EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
em Biociências e Biotecnologia em Saúde  
do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências.

Aprovada em: 29/06/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais**  
**Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz)**

---

**Dra. Sheilla Andrade de Oliveira**  
**Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz)**

---

**Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos**  
**Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz)**

---

**Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura**  
**Universidade de Pernambuco**

---

**Dr. André de Lima Aires**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

Em memória à minha querida e amada avó Judith do Vale Pereira. Uma grande incentivadora e exemplo de força, fé e determinação na minha vida. Te amarei eternamente.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Senhor Jesus, pela força e renovação da fé, e por guiar meus passos para alcançar meus objetivos e sonhos.

Ao meu amado marido, Glauber Barros, que sempre me ajudou a superar as dificuldades encontradas e pela dedicação e amor em todos estes momentos.

À minha querida mãe, Miriam Matos, pela coragem, incentivo, cumplicidade e apoio para a conclusão de mais uma etapa de minha vida.

À minha orientadora, Dra. Clarice Morais, e à minha co-orientadora, Dra. Silvia Montenegro, pelos ensinamentos, estímulos e empenho durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Ana Lúcia Coutinho e Dr. Edmundo Lopes do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE pelo apoio e conhecimentos gerados durante a seleção dos pacientes.

À minha grande amiga, Dra. Pietra Lemos Costa, que sempre esteve presente em importantes momentos da minha vida. Obrigada pelos incentivos, conselhos e pela sua amizade.

Aos meus colegas de doutorado, Anna Lígia Figueiredo, Heytor Costa, Raul Emídeo e Elisa Almeida pelas trocas de conhecimentos, ajudas em experimentos e, principalmente, pela amizade construída neste período do doutorado.

Ao técnico Júlio Moura pelo suporte na coleta de campo dos pacientes.

À Dra. Ana Salustiano do Departamento de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública pelo apoio na confirmação dos marcadores virais.

Ao Dr. George Diniz pelo suporte na análise estatística e por toda paciência e disponibilidade atender aos meus pedidos.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biociências e Biotecnologia em Saúde por todo apoio e amparo que me foram dados.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização desta tese.

À Secretaria Estadual de Saúde, na pessoa de Alexandre Menezes, Barbara Silva e Dr. Eronildo Felisberto, que me concederam anuência para realização do doutorado, além do apoio para realização deste trabalho.

À Secretaria Municipal de Saúde do município de Jaboatão dos Guararapes, na pessoa de Éllyda Vanessa Gomes da Silva, pela anuência e apoio na seleção dos pacientes no município.

À Secretaria Municipal de Saúde do município de Escada pela anuência e apoio na seleção dos pacientes no município.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

BARRETO, Ana Virgínia Matos Sá. Estudo de biomarcadores para morbidade e acompanhamento pós-terapêutico em pacientes com esquistossomose mansoni. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

A fibrose periportal é considerada um sinal patognomônico da esquistossomose e desencadeia a evolução para as formas graves. O estudo de biomarcadores envolvidos na fibrose da doença visa identificar e validar marcadores como novos métodos de diagnóstico da morbidade e avaliação de critério de cura. Objetivamos estudar biomarcadores para predição da fibrose e acompanhamento pós-terapêutico em população de área endêmica para a esquistossomose. 379 pacientes foram avaliados pela US para classificação da fibrose, dos quais 41 (10,8%) foram identificados sem fibrose, 292 (77%) com fibrose leve à moderada e 46 (12,2%) com fibrose avançada para validação do Coutinho-index. Foram dosados fosfatase alcalina (FA) e plaquetas para aplicação do índice, com a fórmula  $FA/(LSN)/plaquetas \times 100$ . Um cut-off de  $>0,228$  com uma área sob a curva ROC de 0,55, sensibilidade 68,2% e especificidade 46,3%, para prever a presença de fibrose. O índice mostrou ausência de fibrose em 46,3% dos pacientes sem fibrose e em 71,6% dos diagnosticados com fibrose moderada e avançada na US. Para confirmar a fibrose avançada, um cut-off de  $>0,326$ ; área sob a curva ROC de 0,70, sensibilidade 65,2% e especificidade 73,1%, identificando em 65,2% dos pacientes na US. Para os biomarcadores moleculares, em 12 indivíduos positivos para *Schistosoma mansoni* e sem tratamento foi verificada a expressão de microRNAs (miR-182 e miR-10a). 3 (25%) pacientes foram identificados sem fibrose e 9 (75%) com fibrose. Foram analisados antes, 30, 90 e 180 dias após o tratamento com praziquantel. Uma correlação positiva entre a carga parasitária e a expressão de miR-182 ( $r=0,72$ ;  $p=0,01$ ) foi observada e o aumento da expressão de miR-10a após o tratamento ( $p=0,04$ ). Os resultados apresentam o Coutinho-index como potencial candidato para predição da fibrose periportal na triagem de pacientes crônicos em áreas endêmicas e o estudo do envolvimento de miRNAs na esquistossomose contribui para a elucidação dos mecanismos de progressão da doença.

**Palavras chave:** Esquistossomose mansoni. Fibrose. Biomarcadores. Fosfatase alcalina. Plaquetas. MicroRNAs.

BARRETO, Ana Virgínia Matos Sá. Study of biomarkers for morbidity and post-therapeutic follow-up in patients with schistosomiasis mansoni. 2018. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

## ABSTRACT

Periportal fibrosis is considered a pathognomonic sign of the schistosomiasis and triggers the evolution to severe forms. The understand biomarkers involved in fibrosis induced by schistosomiasis aims identify and validate these molecules as new methods of diagnosis of morbidity and evaluation of cure criteria. We aimed evaluate biomarkers for periportal fibrosis diagnosis and post-therapeutic follow-up in endemic area for schistosomiasis. Among 379 patients evaluated by the US, to classify the fibrosis pattern, 41 (10.8%) were diagnosed without fibrosis, 292 (77%) with intermediate fibrosis and 46 (12.2 %) fibrosis advanced for the validation of Coutinho-index. We measured the alkaline phosphatase (ALP) and platelet intended application of the index, using the formula  $ALP/(LSN)/platelets \times 100$ . A cutoff of  $>0.228$  (ROC curve of 0.55), 68.2% and 46.3% for sensibility and specificity, respectively. Coutinho-index showed absence of fibrosis in 46.3% of patients without fibrosis and in 71.6% of patients diagnosed with intermediate and advanced fibrosis in the US. To endorse the presence of advanced fibrosis we established a cut-off of  $> 0.366$  (ROC curve of 0.70), sensitivity 65.2% and specificity 73.1%, identifying in 65.2% of patients in the US. Working with molecular, we analyse 12 untreated individuals, *Schistosoma mansoni* positive, to verify expression of microRNAs (miR-182 and miR-10a). 3 (25%) patients have no fibrosis and 9 (75%) presented fibrosis. Blood collection of these patients occurred before treatment, furthermore, 30, 90 and 180 days after treatment with praziquantel. A positive correlation was seen between parasite load and miR-182 expression ( $r=0.72$ ,  $p=0.01$ ) and increase in miR-10a expression after treatment ( $p=0.04$ ). Our results present the Coutinho-index as a potential candidate for the predict of periportal fibrosis in the screening of chronic patients in endemic areas. The involvement of miRNAs in the schistosomiasis contributes to the elucidation of mechanisms of disease progression.

**Keywords:** Schistosomiasis mansoni; Fibrosis; Biomarkers; Alkaline phosphatase; Platelet; MicroRNAs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade no Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthose. Brasil, 2010-2015.....	19
<b>Figura 2-</b>	Imagem ultrassonográfica da fibrose hepática na esquistossomose mansoni.....	25
<b>Figura 3-</b>	Visão geral da biogênese de microRNAs.....	28
<b>Figura 4-</b>	Localização geográfica da Lagoa Olho D'Água e das Unidades de Saúde estudadas no município de Jabotão dos Guararapes.....	41
<b>Figura 5-</b>	Relação entre marcadores biológicos analisados com os grupos de fibrose periportal na população estudada.....	51
<b>Figura 6-</b>	Curvas ROC do Coutinho-index em diferentes grupos de fibrose periportal.....	52
<b>Figura 7-</b>	Expressão de miR-182 em pacientes positivos para o <i>Schistosoma mansoni</i> .....	55
<b>Figura 8-</b>	Expressão do miR-10a em pacientes positivos para o <i>Schistosoma mansoni</i> .....	57
<b>Figura 9-</b>	Expressão de miR-10a e IFN- $\gamma$ em pacientes positivos para o <i>Schistosoma mansoni</i> , antes e pós-tratamento com praziquantel.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Positividade para a esquistossomose mansoni no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, 2010-2016.....	40
<b>Tabela 2 -</b>	Positividade para a esquistossomose mansoni no município de Escada, Pernambuco, 2011-2017.....	42
<b>Tabela 3 -</b>	Padrão de fibrose periportal identificado no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população do município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.....	49
<b>Tabela 4 -</b>	Forma clínica crônica identificada no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população do município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.....	50
<b>Tabela 5 -</b>	Relação entre o Coutinho-index com os grupos de fibrose periportal na população estudada.....	52
<b>Tabela 6 -</b>	Desempenho do Coutinho-index frente ao diagnóstico da fibrose periportal através da ultrassonografia em população de área endêmica para a esquistossomose mansoni.....	53
<b>Tabela 7 -</b>	Padrão de fibrose periportal identificado no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população do município de Escada, Pernambuco.....	54
<b>Tabela 8 -</b>	Correlação da expressão de miR-182 entre as variáveis analisadas na população estudada.....	56
<b>Tabela 9 -</b>	Análise da expressão de miR-10a em amostras pareadas antes e após o tratamento com praziquantel nos indivíduos diagnosticados com esquistossomose mansoni.....	58
<b>Tabela 10 -</b>	Correlação da expressão de miR-10a entre as variáveis analisadas na população estudada.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC - Área abaixo da curva ROC  
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*  
DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas  
ECM - Matriz extracelular  
EDTA - Ácido elitenodícemino tetra-acético  
EHE - Esquistossomose hepatoesplênica  
EHI - Esquistossomose hepatointestinal  
ELISA - *Enzyme linked Immunosorbent Assay*  
FA – Fosfatase alcalina  
Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz  
FPP – Fibrose periportal  
FPP A - Fibrose periportal ausente  
FPP B - Fibrose periportal duvidosa  
FPP C - Fibrose periportal periférica  
FPP D - Fibrose periportal central  
FPP E - Fibrose periportal avançada  
FPP F - Fibrose periportal muito avançada  
HC – Hospital das Clínicas  
HCV – Vírus da Hepatite C  
HDA - Hemorragia Digestiva Alta  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IAM – Instituto Aggeu Magalhães  
IC - Intervalo de confiança  
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública  
LSN – Limite superior de normalidade  
MiRNA - *Micro Ribonucleic Acid*  
MPs – Metaloproteinases  
MMPs - Metaloproteinases da matriz  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PCE - Programa de Controle da Esquistossomose  
PCR – Reação em cadeia de polimerase

PSF - Programa de Saúde da Família

PZQ - Praziquantel

RNA - *Ribonucleic Acid*

ROC - *Receiver Operating Characteristic*

*S. mansoni* – *Schistosoma mansoni*

SISPCE - Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIMPs - Inibidores Tissulares de Metaloproteinases

TTO - Tratamento

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

US – Ultrassonografia

VP – Veia porta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Patogenia e Manifestações Clínicas da Esquistossomose</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Fibrose Hepática na Esquistossomose</b> .....	23
<b>2.3.1</b>	<i>Fibrose periportal</i> .....	23
<b>2.3.2</b>	<i>Imunopatologia</i> .....	25
<b>2.3.3</b>	<i>microRNAs e regulação da fibrose hepática na esquistossomose mansoni</i> .....	27
<b>2.3.4</b>	<i>Biomarcadores na detecção de fibrose hepática</i> .....	31
<b>2.4</b>	<b>Diagnóstico e tratamento da esquistossomose</b> .....	32
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	38
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	38
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
<b>5.1</b>	<b>Desenho de estudo</b> .....	39
<b>5.2</b>	<b>Local de estudo</b> .....	39
<b>5.3</b>	<b>Cálculo da amostra</b> .....	42
<b>5.4</b>	<b>População de estudo</b> .....	43
<b>5.5</b>	<b>Critérios de exclusão</b> .....	43
<b>5.6</b>	<b>Ultrassonografia do abdômen superior</b> .....	44
<b>5.7</b>	<b>Dosagem dos marcadores biológicos</b> .....	45
<b>5.8</b>	<b>Coutinho-index</b> .....	45
<b>5.9</b>	<b>Ensaio de expressão de microRNAs</b> .....	46
<b>5.10</b>	<b>Análise estatística</b> .....	47
<b>5.11</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	47
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>6.1</b>	<b>Caracterização da população para validação do Coutinho-index</b> .....	49
<b>6.2</b>	<b>Relação entre níveis de fosfatase alcalina e o número de plaquetas com os graus de fibrose periportal</b> .....	50
<b>6.3</b>	<b>Coutinho-index na predição da fibrose periportal em população de área</b>	

	endêmica para a esquistossomose mansoni.....	51
<b>6.4</b>	<b>Caracterização da população para a expressão e quantificação de microRNAs.....</b>	<b>53</b>
<b>6.5</b>	<b>Análise da expressão de RNAs (microRNAs e mRNAs).....</b>	<b>54</b>
<i>6.5.1</i>	<i>Expressão e quantificação de miR-182.....</i>	<i>54</i>
<i>6.5.2</i>	<i>Expressão e quantificação de miR-10a.....</i>	<i>56</i>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVA.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE A – artigo submetido.....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICE B – artigo publicado.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE C – artigo publicado.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE D – artigo publicado.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE E – TCLE estudo de validação.....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE F – TCLE estudo de biomarcadores moleculares.....</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE G – Ficha do paciente.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO A – Parecer CEP/IAM.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO B – Parecer CEP/IAM.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose ainda é considerada uma das mais importantes e a segunda infecção parasitária humana com o maior número de óbitos (COLLEY et al., 2014). Acomete mais de 215 milhões de indivíduos em áreas rurais, peri-urbanas e urbanas de 73 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). A doença é frequentemente crônica e no Brasil, é causada por trematódeos da espécie *Schistosoma mansoni*, sendo considerada uma das mais importantes endemias parasitárias no país. A maioria dos casos da doença ocorre na região Nordeste, onde os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia apresentam as maiores prevalências (BRASIL, 2014).

O estado de Pernambuco possui em torno de 15% da população infectada e ocupa o 3º lugar em prevalência na Região Nordeste, sendo a esquistossomose considerada uma das principais causas de mortalidade dentre as doenças transmissíveis (BRASIL, 2014). Nos últimos anos, observou-se aumento considerável dos casos diagnosticados, atingindo em torno de 17 mil no Estado (SILVA; DOMINGUES, 2011). E cerca de 40% dos casos de óbitos atribuídos à esquistossomose no país são oriundos de Pernambuco, o qual vem sendo ao longo dos últimos anos, responsável pelo maior número de óbitos pela doença no país (BRASIL, 2011).

Na patogenia da esquistossomose, o fígado é o principal órgão afetado, pois logo após a oviposição pelas fêmeas nas veias mesentéricas, os ovos, não eliminados nas fezes, são levados pela circulação sanguínea para o interior do órgão. Estes ovos ficam presos nos pequenos vasos do fígado, induzindo uma vigorosa resposta imune com a formação de granulomas (ABATH et al., 2006). Devido à contínua oviposição e formação de novos granulomas em torno desses ovos, as lesões hepáticas progridem (BARSOUM et al., 2013). A infecção crônica e o processo inflamatório granulomatoso conduzem ao excesso de depósito de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular nas ramificações intra-hepáticas da veia porta, causando a fibrose periportal (FPP), caracterizada por ser um sinal patognomônico da esquistossomose hepática (AZEREDO et al., 2015; MACHADO et al., 2002).

Na infecção ocasionada pelo *S. mansoni*, a maioria dos indivíduos infectados é assintomática, mas em torno de 10% destes, evoluem para as formas mais crônicas e graves da doença (LEITE et al., 2013). A ausência de diagnóstico ou tratamento oportuno contribui para a progressão do processo fibrogênico, podendo resultar na forma mais severa da doença, a hepatoesplênica (EHE) com a formação de hipertensão portal, varizes de esôfago e

recorrente hemorragia digestiva alta (HDA), podendo levar o paciente ao óbito (MEDEIROS et al., 2014).

A avaliação da FPP fornece informações úteis para a adoção das medidas terapêuticas em pacientes infectados pelo *S. mansoni*. Geralmente a fibrose na esquistossomose é avaliada pela ultrassonografia (US) abdominal, sendo a técnica de imagem de escolha e apresenta uma abordagem importante no hospital e em campo para identificar a morbidade da doença (PINTO-SILVA et al., 2010; RICHTER et al., 2016).

Devido às limitações na utilização da US no diagnóstico da FPP e das formas clínicas da esquistossomose, como disponibilidade do equipamento, operadores treinados e não está prontamente disponível em todas as áreas endêmica (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007; MEDEIROS et al., 2014), a identificação de outros testes de laboratório de rotina não invasivos, mais baratos e de simples execução, como marcadores biológicos, apresenta-se como um promissor campo de pesquisa.

O presente grupo de pesquisa tem desenvolvido diversos estudos com marcadores bioquímicos, hematológicos, imunológicos e moleculares envolvidos nos processos patológicos da esquistossomose, com a finalidade de identificar biomarcadores com potenciais usos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico da infecção e morbidade, terapêutico e avaliação de critério de cura.

Estudos recentes tem demonstrado grande interesse no mecanismo de controle da expressão gênica mediado pelos microRNAs (miRNA). Os miRNAs são moléculas de RNA não codificantes de aproximadamente ~22 nucleotídeos de comprimento, que se ligam e inibem a tradução de mRNA por inibição translacional ou por sua degradação e participam da regulação dos níveis proteicos da célula, controlam ativamente a homeostase, com grande implicação no desenvolvimento embrionário, proliferação, diferenciação e metabolismo celular (PEREIRA et al., 2015).

Níveis elevados de miRNAs circulantes são comumente associados ao início e progressão da patologia em doenças humanas. Assim, miRNAs circulantes no soro vem surgindo como promissores para o diagnóstico de uma variedade de doenças (SETHI et al., 2018). A detecção de miRNAs do *S. mansoni* ou do hospedeiro no soro de pacientes infectados, vem sendo indicados como potenciais marcadores biológicos para infecção, morbidade e critério de cura pós-terapêutica (HOY et al., 2014). Entre os miRNAs expressos pelos indivíduos infectados tanto com *S. japonicum* e pelo *S. mansoni* foi verificado uma maior expressão de miR-10a e miR-182 (CABANTOUS et al., 2017; KELADA et al., 2013) e

estudos em modelos murinos demonstraram o envolvimento destes miRNAs no processo de fibrogênese hepática esquistossomótica (HUANG et al., 2018).

Barreto e et al. (2017) avaliaram biomarcadores bioquímicos, hematológicos e imunológicos como potenciais preditores da FPP em 116 pacientes provenientes de ambulatório hospitalar de referência para os casos crônicos e graves da esquistossomose no estado de Pernambuco. Os resultados alcançados mostraram êxito no desenvolvimento de um índice biológico, com os biomarcadores fosfatase alcalina e plaquetas (Coutinho-index =  $FA(LSN)/\text{plaquetas} \times 100$ ), denominado Coutinho-index (em homenagem ao professor Amaury Domingues Coutinho, um exemplo de grande pesquisador e incentivador de diversas pesquisas sobre esquistossomose no Brasil, principalmente em nossa região). O Coutinho-index mostrou melhor desempenho na predição da FPP avançada com uma área abaixo da curva ROC de 0,994 ( $p = 0,0001$ ) com sensibilidade de 98% e especificidade de 94,7%, em que 98% dos pacientes estudados apresentaram os resultados de FPP avançada, de acordo com o diagnóstico através do exame de US.

O desenvolvimento de pesquisa de campo em área endêmica para a esquistossomose mansoni na tentativa de avaliar a FPP através de biomarcadores confirmará a sua utilização como método valioso para a detecção dos estágios mais avançados da fibrose em possíveis pacientes assintomáticos. Dessa forma, pode contribuir para um diagnóstico mais rápido da progressão da doença, sendo fundamental para a determinação das estratégias de tratamento e no prognóstico, diminuindo o risco de complicações. Ademais, o papel dos miRNAs na patologia causada pelo *S. mansoni* permanece ainda não esclarecido, o estudo da expressão de RNAs (miRNA e mRNA) apresenta-se como uma poderosa e moderna ferramenta para análise na pesquisa clínica, com a possibilidade de identificação da regulação da expressão gênica de citocinas envolvidas no processo fibrogênico, através de miRNAs, contribuindo para a elucidação da base molecular da patologia, e poderá indicar novos alvos de diagnóstico da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico.

## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Epidemiologia

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são caracterizadas por um grupo de enfermidades causadas por agentes infectoparasitários e são consideradas endêmicas, principalmente, em populações de baixa renda. Também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos, inovação tecnológica e em políticas públicas para o seu controle. Contribuindo para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países afetados (MOLYNEUX, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, atualmente 17 doenças parasitárias crônicas são classificadas como DTN, entre as quais estão as leishmanioses, hanseníase, tracoma, doença de Chagas, filariose, oncorcercose, esquistossomose, entre outras (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Mais de um bilhão de pessoas são acometidas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial, e essas doenças, em conjunto, matam um milhão de pessoas por ano, além de causar impacto na produtividade dos trabalhadores e manutenção de países de baixa renda em situação de pobreza (PONTES, 2009).

A esquistossomose é considerada uma das DTN resultante da falta de investimentos na produção de novos medicamentos, diagnósticos e priorização de políticas públicas que alcance medidas efetivas para interrupção da transmissão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). É uma doença de veiculação hídrica cuja transmissão ocorre quando um indivíduo suscetível entra em contato com águas onde existem caramujos do gênero *Biomphalaria* liberando a forma infectante do parasito, as cercárias.

Estima-se que mais de 215 milhões de pessoas no mundo possam estar infectadas com uma das três principais espécies de *Schistosoma* e 700 milhões de pessoas estão vulneráveis ao risco de infecção pelo parasito nas regiões tropicais do globo, onde a doença é registrada em 73 países distribuídos pela África, leste do Mediterrâneo e América (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Não obstante sua magnitude, expressa no número de doentes, sua cronicidade com casos graves, ampla distribuição geográfica e repercussão socioeconômica, a esquistossomose está entre as parasitoses de grande relevância na saúde pública, sendo considerada a segunda infecção parasitária humana com o maior número de óbitos (COLLEY et al., 2014).

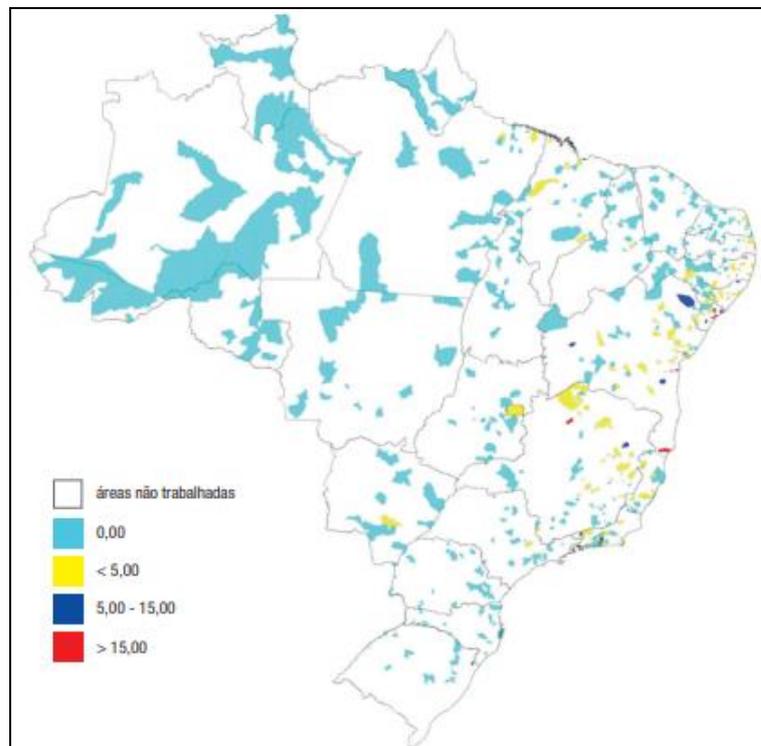
Nos países da América Latina e região do Caribe, apenas infecções pelo *Schistosoma mansoni* são encontradas. Apesar dos esforços para o controle da esquistossomose, o Brasil é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2009). Em 2012, o Brasil e a Venezuela informaram a realização de tratamento para esquistossomose, com a droga de escolha (praziquantel), em 27.460 pessoas nos dois países, das quais 99% eram brasileiras (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

Atualmente, no país, a esquistossomose ocorre em 19 das 27 unidades federadas (Figura 1), abrangendo uma área considerada endêmica que vai desde o estado do Rio Grande do Norte em direção ao Sul, incluídas as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde se interioriza alcançando Minas Gerais, no Sudeste, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas, além de estar presente, de forma localizada, em outros estados de todas as cinco grandes regiões do país (BRASIL, 2014).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, a série histórica do percentual de positividade no período de 1990 a 2010 aponta uma prevalência média de 8% e uma tendência de decréscimo de 0,25% ao ano, entretanto, neste mesmo período apresentou um número expressivo de formas graves, com uma média de 1.567 internações e 527 óbitos (BRASIL, 2012). Em 2013, os estados mais afetados foram Alagoas, Sergipe, Paraíba e Pernambuco com 7,2%, 6,8%, 5,5% e 4,2%, respectivamente, de pessoas com resultados positivos (BRASIL, 2014).

Dados do Ministério da Saúde apontam a região Nordeste do Brasil como responsável pelo maior registro de casos de esquistossomose e situam Pernambuco entre os estados com prevalência média mais elevada de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*. Considera-se a endemia uma das principais causas de mortalidade por doença transmissível (BRASIL, 2012).

**Figura 1** – Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade no Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminiose Brasil, 2010-2015.



Fonte: Katz (2018).

Uma avaliação da situação da doença em Pernambuco, no ano de 2010, verificou que a ocorrência da esquistossomose no estado é considerada endêmica em 102 (55,2%) de seus 185 municípios, principalmente nas regiões da Zona da Mata e Metropolitana do Recife. A média anual de internação, no período de 2005 a 2010 foi de 133 internações e o número médio de óbitos, no mesmo período, chegou a 190 óbitos (BRASIL, 2011). O estado apresentou no período de 2005-2014 a maior taxa de mortalidade quando comparada ao Brasil e com a região Nordeste, representando que cerca de 40% dos casos de óbitos atribuídos à esquistossomose são oriundos de Pernambuco, o qual vem sendo ao longo dos últimos anos, responsável pelo maior número de óbitos pela doença no país (PERNAMBUCO, 2015).

Um estudo analisou a tendência da positividade da esquistossomose mansoni detectada nos exames coproscópicos de população que vive em área endêmica do estado no período de 2005 a 2010 (BARRETO et al., 2015). Embora o resultado tenha apresentado uma tendência significativa de redução da positividade em Pernambuco, vale ressaltar a dinâmica de transmissão focal da esquistossomose em áreas restritas, internas aos municípios pernambucanos, com elevado número de indivíduos positivos e prevalência da doença de até 70% (SAUCHA et al., 2015). Demonstrando que este perfil de elevada transmissão focal

revela a necessidade de ações contínuas de vigilância e controle da esquistossomose em Pernambuco.

Antes considerada uma endemia estritamente rural e doença da pobreza, a esquistossomose expande-se para áreas urbanas e litorâneas da Região Metropolitana de Pernambuco, com a ocorrência de casos agudos e crônicos e focos de moluscos hospedeiros intermediários. Na forma de surtos epidêmicos ou estabilizada como endemia, a doença assume características epidemiológicas, clínicas, econômicas e socioculturais distintas daquelas encontradas nas zonas rurais do Estado (BARBOSA et al., 2010, 2011, 2013, 2015, GOMES et al., 2016a, 2016b).

Embora o diagnóstico e tratamento da esquistossomose sejam relativamente simples, o controle da doença é uma das tarefas mais difíceis dos serviços de saúde pública em razão de: ampla difusão dos hospedeiros intermediários; mecanismos de escape com relação à existência dos métodos de controle atuais; frequência do contato humano com a água em atividades agrícolas, domésticas e/ou lazer; dinâmicas próprias de cada microfoco de transmissão; alto custo das obras de engenharia sanitária que garantam abastecimento de água adequado para as residências e eliminação dos dejetos, impedindo, assim, a contaminação dos recursos hídricos. Além disso, existe ainda: as limitações do tratamento individual e em massa; falta de abordagem preventiva associada à curativa na organização dos serviços; e a inexistência de uma vacina capaz de prevenir a doença (CARACIOLO et al., 2016; COSTA et al., 2017; QUITES et al., 2016).

A OMS estabeleceu um plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas e negligenciadas até 2022, propondo atividades atualizadas, claras e inovadoras para reduzir a morbidade, a incapacidade e a mortalidade, com o objetivo de acelerar o progresso dos esforços para eliminar essas doenças da lista de problemas de saúde pública e impedir a transmissão dessas doenças entre e para os seres humanos. O plano de ação aborda, principalmente, a vigilância, o manejo, o controle e a eliminação de 13 doenças, entre as quais, a esquistossomose, sendo o Brasil considerado um dos países para ser signatária deste plano por apresentar focos atuais de transmissão da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

## **2.2 Patogenia e Manifestações Clínicas da Esquistossomose**

A patologia da esquistossomose mansoni é desencadeada, principalmente, por uma resposta imunológica que ocorre em torno dos ovos vivos do parasito retidos nos tecidos do

hospedeiro (COLLEY et al., 2014). O fígado é o principal órgão afetado, uma vez que os ovos não eliminados nas fezes são levados pela circulação sanguínea e ficam presos nos pequenos vasos portais do fígado, induzindo uma vigorosa resposta imune com a formação de granulomas (ALMADI et al., 2011). A resposta granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia mediada por células T CD4<sup>+</sup> (ABATH et al., 2006), com a participação de eosinófilo, macrófagos ativos e citocinas produzidas por linfócitos Th2 (CHUAH et al., 2014).

O surgimento de lesões e das formas clínicas da esquistossomose depende de fatores relacionados ao parasito como: cepa, fase evolutiva e intensidade da infecção; fatores intrínsecos do indivíduo: idade, estado nutricional, background genético e a resposta imunológica; como também a carga parasitária adquirida e a frequência de exposições. A evolução clínica pode variar desde formas assintomáticas até as extremamente graves. A doença se desenvolve em duas fases, uma aguda e uma crônica, correspondendo ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro (COLLEY et al., 2014).

A fase aguda é caracterizada pela dermatite cercariana e pela febre de Katayama. A dermatite cercariana ocorre após a penetração das cercárias no hospedeiro e pode provocar um quadro de dermatite urticariforme, com micropápulas eritematosas e pruriginosas, de duração geralmente transitória que cede quase sempre espontaneamente (BARSOUM et al., 2013). Nesta fase, devido aos sintomas inespecíficos, o diagnóstico torna-se difícil, mas o histórico epidemiológico de exposição à coleções hídricas sugestivas de contaminação, contribui para o diagnóstico. A febre de Katayama é em decorrência da migração das formas imaturas do parasito, os esquistossômulos, ocorrendo em algumas semanas após a infecção. É caracterizada por linfodenopatia, mal-estar, febre, fadiga, mialgia, cefaléia, indisposição e tosse seca, durando de 2 a 10 semanas. Ao exame físico, o paciente pode apresentar leve aumento do fígado e do baço e no exame laboratorial, uma eosinofilia elevada (KAPOOR, 2014; ROSS et al., 2007).

Os sintomas clínicos da fase aguda raramente ocorrem em populações de áreas endêmicas, mas é comum entre indivíduos, como visitantes e emigrantes, que se expõem pela primeira vez ao estágio infectante (cercárias) do parasito em coleções hídricas contaminadas (BARRETO et al., 2016; ENK et al., 2010).

Em indivíduos que não foram tratados ou a contínua exposição à forma infectante do parasita com casos de reinfecção, a doença pode evoluir para a fase crônica, com sinais de progressão da doença para diversos órgãos e com níveis extremos de gravidade. As formas

crônicas são mais prevalentes e mais associadas à morbidade em áreas endêmicas (COLLEY et al., 2014).

A classificação das formas crônicas da esquistossomose contempla uma escala crescente de gravidade, sendo de acordo com os órgãos acometidos. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, atualmente, a fase crônica da doença é dividida e classificada em três formas clínicas: hepatointestinal, hepática e hepatoesplênica (BRASIL, 2014).

A esquistossomose hepatointestinal (EHI) é a forma mais encontrada nas regiões endêmicas, entretanto, a maioria dos indivíduos infectados não apresentam sintomas e o diagnóstico é realizado através do encontro de ovos do *S. mansoni* no exame copróscopico de rotina nos serviços de saúde (BRASIL, 2014; PORDEUS et al., 2008). Nas pessoas com queixa clínica, caracteriza-se por sintomas digestivos como náuseas, vômitos, dor epigástrica, flatulências, podendo ocorrer surtos diarreicos ou constipação intestinal crônica. No exame físico, o fígado pode ser palpável, devido ao leve aumento de volume e nos casos mais avançados dessa forma clínica pode-se observar a presença de tecido fibrótico nos espaços intra-hepáticos do sistema porta pelo exame de ultrassonografia (US) do abdômen superior, representando um quadro de evolução da doença (BARSOUM et al., 2013; BRASIL, 2014).

Na forma hepática ocorre o estabelecimento da hepatomegalia, presença de fibrose moderada ou intensa na US, mas sem esplenomegalia e sem os sinais e sintomas da hipertensão portal (BRASIL, 2014). Devido à contínua oviposição pelas fêmeas do *S. mansoni* e o acúmulo da formação de novos granulomas em torno desses ovos, as lesões hepáticas se tornam mais graves, resultando no aumento da pressão sanguínea no sistema porta, porque o fígado se torna fibrótico. Com o evoluir da doença, a fibrose progride, congestionando o fluxo sanguíneo da veia intra-hepática portal, o que contribui para o desenvolvimento da forma mais avançada e grave da doença, a esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (MANZELLA et al., 2008).

Resultados de estudos de inquéritos epidemiológicos apresentam que em torno de 10% dos pacientes infectados por *S. mansoni* de áreas endêmicas, evoluem para a forma mais severa da doença, a EHE (LEITE et al., 2013). A EHE é caracterizada pelo paciente que apresenta os órgãos fígado e baço aumentados de volume (hepatoesplenomegalia), com presença de fibrose hepática moderada a acentuada. Alguns casos de EHE evoluem para uma forma descompensada, resultando no desenvolvimento de hipertensão portal, com ascite, aumento da formação de circulação colateral e varizes gastroesofágicas, as quais podem romper e causar hemorragia digestiva alta (HDA), representando a causa usual de óbitos pela esquistossomose (MEDEIROS et al., 2014). Um estudo descritivo do tipo série de casos foi

realizado em pacientes atendidos em hospital de referência para a forma EHE em Pernambuco e verificou a presença de HDA em 61,6% dos casos avaliados, dos quais 86,7% manifestaram-se por hematêmese (SILVA; DOMINGUES, 2011).

A deposição ectópica de ovos do *S. mansoni* pode levar a morbidades inesperadas. O mais comum envolve a migração de parasitas ou ovos para o sistema nervoso central, com sintomas de compressão espinhal ou encefalopatia. A mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE) é a forma ectópica mais grave e incapacitante da infecção pelo *S. mansoni*, o envolvimento da medula espinhal pode resultar em dor lombar ou paralisia dos membros inferiores, com fraqueza muscular, perda sensorial e incontinência urinária (BRASIL, 2006; CARVALHO, 2013).

Também há a ocorrência de hipertensão pulmonar por obstrução vascular, provocada por ovos, vermes mortos e/ ou vasculite pulmonar por imunocomplexos. Os sintomas e sinais clínicos caracterizam a síndrome do *cor pulmonale* (BRASIL, 2014; PAPAMATHEAKIS et al., 2014).

## 2.3 Fibrose Hepática na Esquistossomose

### 2.3.1 Fibrose periportal

A fibrose hepática é uma resposta de reparo às lesões no fígado, caracterizada por deposição excessiva de proteínas de matriz extracelular (ECM) e pode ser induzida por uma variedade de fatores como o abuso de drogas, álcool e gordura, alergias crônicas e diferentes agentes infecciosos. Resulta do dano crônico ao fígado em conjunto com o acúmulo de elementos ECM como colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas, caracterizando as doenças hepáticas crônicas (EBRAHIMI et al., 2016; FRIEDMAN, 2008; JIAO et al. 2009).

O processo fibrogênico pode ser considerado como o resultado de um desequilíbrio entre a síntese da ECM e sua degradação. O equilíbrio entre as metaloproteinases da matriz (MMPs) e os inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs) é crucial para a homeostase da ECM, gerando um balanço entre as ações de síntese (fibrogênese) e degradação (fibrólise) da ECM, sendo este mecanismo importante para o sucesso do reparo de danos causados ao tecido hepático (EBRAHIMI et al., 2016)

Diferentes populações de células desempenham papéis no processo fibrogênico, mas a ativação das células estreladas hepáticas é o evento dominante na fibrogênese e consiste na alteração fenotípica dessas células em fibroblastos e miofibroblastos proliferativos e

fibrogênicos. Os miofibroblastos desenvolvem funções contrácteis, acumulam-se em locais de lesão e secretam as proteínas da ECM formando a fibrose (ANTHONY et al., 2010; KISSELEVA, 2017; MEDERACKe et al., 2013).

As células estreladas hepáticas são responsáveis pela formação da ECM, sendo importante para manter a função diferenciada de todas as células residentes no fígado. Porém, com o processo fibrótico, ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM hepática. Nos estágios avançados, o fígado contém aproximadamente seis vezes mais ECM do que o fígado normal, incluindo colágenos (I, III e IV), fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos (EBRAHIMI et al., 2016; FRIEDMAN, 2008).

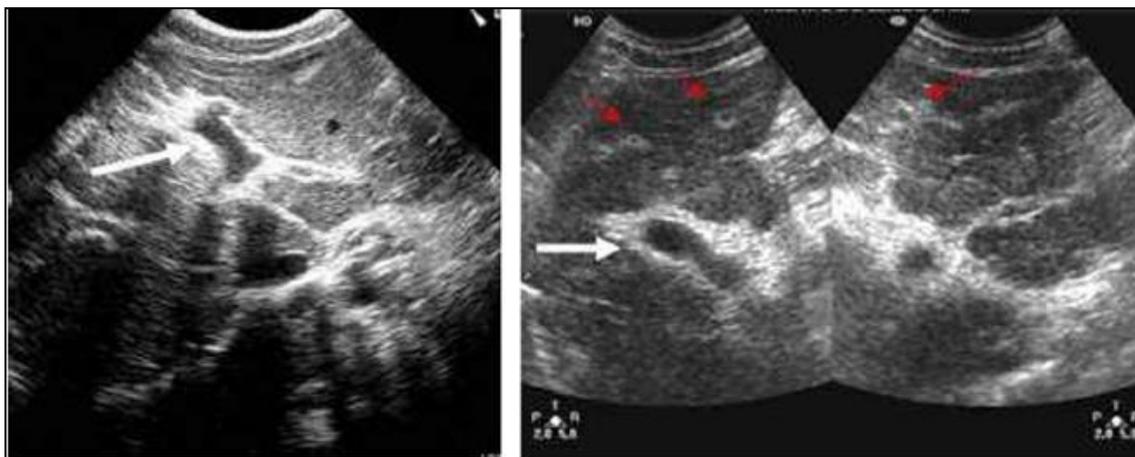
A permanência do agente agressor no fígado resulta em uma maior deposição dos componentes da ECM devido à diminuição da sua degradação pelas MPs ocasionada pela super expressão dos TIMPs (EBRAHIMI et al., 2016). Esse desequilíbrio em conjunto com o acúmulo dos ECM distorce a arquitetura hepática, levando à formação de cicatrizes fibrosas que resultam em alterações estruturais e funcionais.

Na esquistossomose mansoni, a fibrose hepática é decorrente da resposta imunológica granulomatosa em torno dos antígenos liberados pelos ovos do parasito. Devido à contínua oviposição e a formação de mais granulomas em torno desses ovos, as lesões hepáticas se tornam mais graves (BARSOUM et al., 2013). A infecção crônica conduz ao excesso de depósito de colágeno e de outros componentes da ECM nas ramificações intra-hepáticas da veia porta, causando a fibrose periportal (FPP), a qual é considerada como sinal patognomônico da esquistossomose hepática (AZEREDO et al., 2015; MACHADO et al., 2002).

A FPP é a alteração que permite identificar a doença, caracterizada no exame ecográfico como área de hiperecogenicidade periportal. Portanto, é limitada ao espaço periportal, sem haver comprometimento do parênquima hepático nem progressão para cirrose (AZEREDO et al., 2010, 2015; BARSOUM et al., 2013).

O espessamento periportal tanto pode acometer o tronco da veia porta e seus ramos, definindo uma FPP central, como se estender para os ramos intra-hepáticos periféricos de menor calibre, caracterizando a FPP periférica (Figura 2). Este acometimento tem intensidade variável, refletindo o grau de comprometimento vascular. Observa-se o parênquima hepático com textura e ecogenicidade normais, já que não há envolvimento parenquimatoso (AZEREDO et al., 2015).

**Figura 2** – Imagem ultrassonográfica da fibrose hepática na esquistossomose mansoni.



Fonte: Barsoum et al. (2013).

**Nota:** As setas brancas indicam a fibrose periportal central e as setas vermelhas a fibrose periférica em um paciente com esquistossomose hepatoesplênica avançada.

O acúmulo de tecido fibroso em torno dos vasos do sistema porta hepático leva a obstrução do fluxo sanguíneo portal, resultando em hipertensão portal e suas sequelas (AZEREDO et al., 2015) como ascite, varizes gastroesofágicas e hemorragia digestiva, esta última considerada a principal causa de mortalidade associada com a esquistossomose.

A avaliação da presença da FPP é de primordial importância na determinação das estratégias de acompanhamento da resposta do paciente à terapia adotada, prognóstico, monitoramento das formas clínicas e do risco potencial para o desenvolvimento de complicações em pacientes com a forma grave hepatoesplênica (BARRETO et al., 2017).

### 2.3.2 Imunopatologia

A principal imunopatologia resultante da esquistossomose mansoni é desencadeada por uma inflamação granulomatosa crônica, considerada uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia mediada por células T CD4<sup>+</sup> (ABATH et al., 2006), com a participação de eosinófilo, macrófagos ativos e citocinas produzidas por linfócitos Th2 (CHUAH et al., 2014) contra os ovos que ficam presos nos pequenos vasos intra-portais do fígado (ALMADI et al., 2011). Quando esta reação granulomatosa não é controlada, o fígado torna-se fibrótico.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar, principalmente, em dois tipos de células T efetoras, denominadas Th1 (as quais produzem as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e Th2

(que produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). As respostas das citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) estão relacionadas à diminuição da fibrose na esquistossomose, enquanto que as citocinas Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) desempenham um papel crítico funcionam na patogênese da doença (BRANDT et al., 2010).

Os estudos sobre a resposta imune na esquistossomose hepática ilustram claramente o envolvimento da resposta das células T CD4+ na progressão da doença. Uma resposta do tipo Th1 é iniciada nos estágios agudos da infecção e caracterizada pelo aumento da expressão das citocinas pro-inflamatórias IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Após o início da deposição dos ovos, a resposta imune muda para uma resposta mais vigorosa do tipo de Th2, sendo caracterizada pela produção de níveis elevados das IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e a síntese de IgE. À medida que a infecção evolui para um estágio mais crônico, uma imunomodulação da resposta Th2 é observada, podendo ser conduzida pela IL-10 e TGF- $\beta$  que induzem as células T reguladoras (Tregs), que regulam o equilíbrio das respostas Th1/Th2. Recentemente, as células Th17 foram associadas à inflamação hepática na esquistossomose, entretanto, seu papel regulação da patologia granulomatosa, ainda não está claro (CHUAH et al., 2014; MORAIS et al., 2008).

Muitas citocinas estão envolvidas na regulação da produção de proteínas da matriz extracelular nos processos fibrogênicos. A IL-13 é considerada uma citocina pró-fibrótica, sendo assim, relacionada ao desenvolvimento da fibrose hepática induzida pelo *S. mansoni*. No fígado, a IL-13 está associada à progressão da fibrose, pois pode induzir a produção de colágeno, de TGF- $\beta$  e genes associados à fibrose no carcinoma hepatocelular. O seu papel nas doenças hepáticas crônicas tem sido estudado de forma mais extensa em modelos de infecção experimental com *S. mansoni*, levando à formação de granulomas e subsequente desenvolvimento de fibrose hepática. Vários estudos mostraram que a IL-13 é a citocina Th2 profibrótica predominante na infecção pelo *S. mansoni*, e seu bloqueio previnem a fibrogênese hepática (FIGUEIREDO et al., 2016; GIESECK et al. 2018).

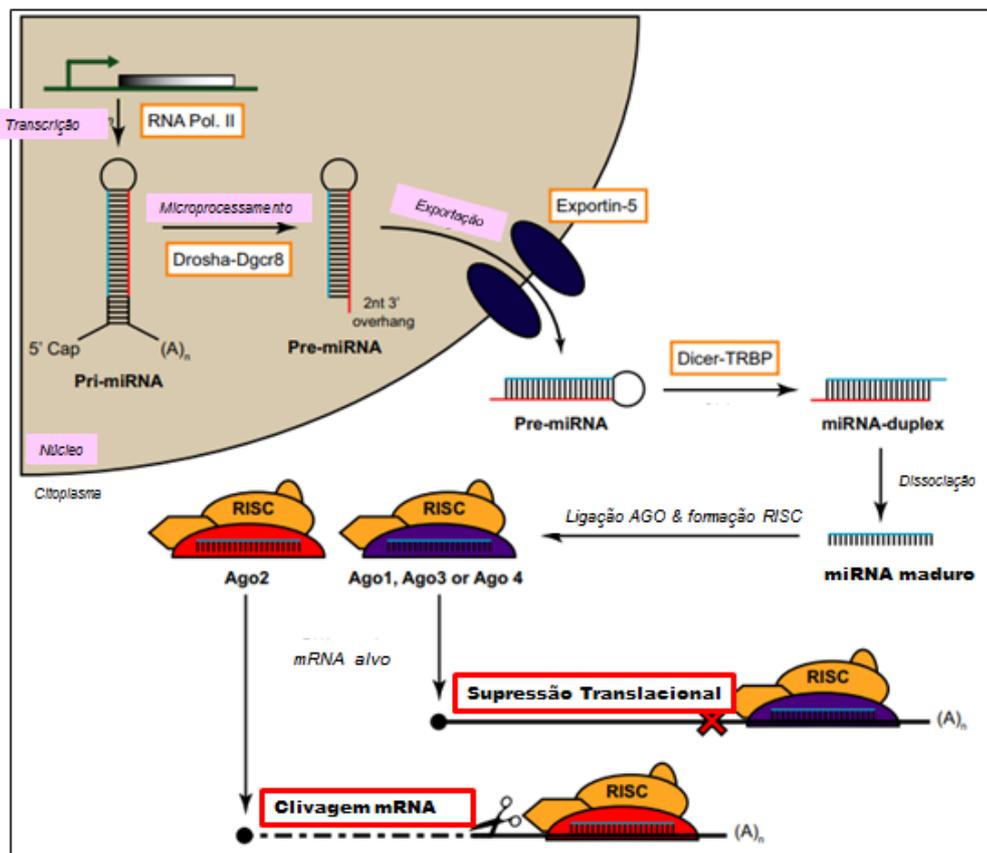
O IFN- $\gamma$  exerce um papel na regulação da ativação de fibroblastos e na síntese de colágeno através da inibição da diferenciação das células estreladas hepáticas e, conseqüentemente, a produção de ECM; e aumenta a atividade das collagenases do fígado pela estimulação da síntese de MP e pela inibição da síntese dos TIMPs (HENRI et al., 2002). De fato, o IFN- $\gamma$  é considerado uma citocina antifibrótica, já que casos de FPP severa foram associados com baixos níveis de IFN- $\gamma$  (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002) e que em modelos murinos, o IFN- $\gamma$  inibe a deposição de colágeno (STAVITSKY, 2004).

Assim, baixos níveis na produção de IFN- $\gamma$  e níveis elevados de IL-13 têm sido associados com um aumento no risco de desenvolver fibrose hepática severa na esquistossomose (ALVES-OLIVEIRA et al., 2006; DeJESUS et al., 2004; GIESECK et al. 2017).

### 2.3.3 *microRNAs e regulação da fibrose hepática na esquistossomose mansoni*

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não-codificantes que apresentam uma fita simples contendo de 20 a 24 nucleotídeos (nt) de extensão e atuam principalmente na regulação negativa da expressão gênica, desestabilizando mRNAs e/ou interferindo na produção das proteínas que os codificam (MISKA, 2005; PEREIRA et al., 2015). A abundância de determinado miRNAs é resultado do balanço entre sua biossíntese (ou biogênese) e sua degradação.

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação. Os miRNAs são produzidos a partir de percussores de RNA em forma de grampo denominados miRNAs primários (pri-miRNAs). Na maioria dos casos, a transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, uma enzima que também é responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas. Os nucleotídeos dos pri-miRNAs apresentam uma estrutura de *stem-loop*, ou seja, um tronco que apresenta 33-35 pares de bases, um terminal em forma de alça e segmentos de fita simples de RNA tanto no lado 5' como no lado 3'. No núcleo, os pri-miRNAs são processados por um complexo que inclui Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita. A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5, com auxílio da proteína de transporte nuclear RAN-GTP. Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é convertido em duplex de miRNA através do complexo de Dicer, que remove a alça na estrutura *stem-loop*. Este duplex de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, contendo proteínas AGO2), no qual as duas fitas de RNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar sofre degradação. Os miRNAs normalmente regulam os níveis de transcrição pela ligação às 3' UTR de seus mRNAs-alvo, modulando os níveis proteicos (Figura 3) (ARANTES et al., 2015; LIU, 2016).

**Figura 3** – Visão geral da biogênese de microRNAs.

Fonte: Entwistle e Wilson (2016).

Nota: Ago = proteínas do tipo Argonautas; RISC = Complexo de silenciamento induzido por RNA.

A interação entre miRNAs e seus alvos constitui um sistema complexo onde um único miRNA pode interagir e regular diversos alvos e, por outro lado, diversos miRNAs podem controlar um mesmo alvo. Os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos essenciais como regulação de ciclo celular, apoptose, desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular (MISKA, 2005), e até o ano de 2015, mais de 2.500 sequências maduras de miRNAs foram caracterizadas no genoma humano (PEREIRA et al., 2015).

A manutenção dos níveis fisiológicos de miRNAs é crucial para o desenvolvimento normal, uma vez que perturbações estão associadas a inúmeras doenças já descritas em humanos (LEI et al., 2018; SETHI et al., 2018; VAISHYA et al., 2018), mostrando que os miRNAs exercem papel crucial no desenvolvimento de muitas doenças, podendo ser também marcadores do seu progresso, prognóstico, diagnóstico e na avaliação da resposta ao tratamento (YAO et al., 2017).

Uma vez que os miRNAs atuam como reguladores pós-transcricionais em muitos organismos, estudos foram realizados para determinar o papel que desempenham no

*Schistosoma*. Esses estudos apoiam a noção de que os miRNAs podem ser reguladores importantes para o desenvolvimento do *Schistosoma* e potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos contra a esquistossomose. Além disso, descobertas recentes forneceram novas informações sobre os papéis dos miRNAs no desenvolvimento do parasito e na patogênese da esquistossomose e no banco de dados miRBase, estão documentados as sequências de aproximadamente 225 miRNA de *S. mansoni*. (CABANTOUS et al., 2017; HOY et al., 2014; ZHU et al., 2014).

Análises integrativas dos perfis de miRNAs e mRNAs no fígado de modelos experimentais (camundongos) infectados pelo parasito sugerem que os miRNAs e seus correspondentes mRNA alvos, podem funcionar coordenadamente para regular o processo fibrogênico do hospedeiro durante a infecção pelo *Schistosoma*. Nesse mesmo estudo, os autores identificaram que miRNAs derivados do parasita podem ser detectados em soros de indivíduos infectados e podem distinguir entre infecções com exame parasitológico negativo e positivo tanto em áreas de baixa ou alta intensidade de infecção, apresentando resultados com alta especificidade e sensibilidade (HOY et al., 2014).

Na infecção pelo *S. japonicum* (causa inflamação hepática crônica com o desenvolvimento de fibrose, assim como na infecção pelo *S. mansoni*) analisaram os mecanismos reguladores alterados na fibrose hepática e mostraram que a fibrose grave resulta dos efeitos cumulativos da desregulação de muitas vias (CABANTOUS et al., 2017). Como os miRNAs demonstraram ser reguladores críticos pós-transicionais exercendo controle sobre diversas doenças, mudanças na produção de miRNA poderiam estar possivelmente envolvidas no desenvolvimento de fibrose severa (CABANTOUS et al., 2017). Estudos em animais mostraram que vários miRNAs contribuem para a progressão da fibrose (CAI et al., 2015; HONG et al., 2017).

De fato, um painel de miRNAs mostrou-se desregulado em tecido hepático murino infectado por *S. japonicum*, sugerindo um papel para essas moléculas na regulação da fibrose ocorrida durante a infecção (HOY et al., 2014). Cabantous et al. (2017) apresentam evidências de que miRNAs (hsa-miR-150-5p; hsa-miR-146b-5p; hsa-miR-143-3p; hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-31-5p; hsa-miR-4521; hsa-miR-22-3p; hsa-miR-221-3p) expressos pelos indivíduos infectados com *S. japonicum* desempenham um papel importante na fibrose hepática, atuando no metabolismo, organização das proteínas da matriz, mobilização lipídica e limitação do estresse por dano oxidativo. Também em modelos murinos na infecção pelo *S. japonicum*, foi verificada uma alta expressão de miR-182 nas amostras de tecido hepático com fibrose (HUANG et al., 2018).

Os miRNAs expressados são cada vez mais reconhecidos como mediadores da comunicação celular e seus papéis regulatórios no sistema imunológico são estabelecidos (FERNANDEZ-MESSINA et al., 2015). Com relação à resposta imunológica, os miRNAs surgiram como os reguladores chave da resposta imune inata e adaptativa (O'CONNEL et al., 2010). Um estudo foi realizado para investigar os mecanismos moleculares da atividade de células T regulatórias (Treg).

Através do perfil de expressão gênica e sequenciamento foram isolados miRNA de Treg de tecido inflamado tipo 1 ou tipo 2 após a infecção por *Leishmania major* ou *Schistosoma mansoni*, respectivamente. Foram identificados dois miRNA: miR-10a e miR-182 reguladores do eixo IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-4/IL-2, respectivamente (KELADA et al., 2013), que fazem parte do conjunto das principais citocinas anti e pró fibroticas na esquistossomose.

As citocinas IL-13 e IL-4 têm atividades biológicas similares e compartilham o mesmo complexo receptor (CALLARD; MATTHEWS; HIBBERT, 1996). Entre essas citocinas, a IL-13 no fígado está associada à progressão da fibrose e vários estudos mostraram que a IL-13 é a citocina profibrótica predominante na infecção pelo *S. mansoni*, e seu bloqueio previne a fibrogênese hepática (FIGUEIREDO et al., 2016; GIESECK et al., 2018). A IL-4 apresenta similaridade na atividade biológica com a IL-13, a qual apresenta-se relacionada ao desenvolvimento da FPP.

Como o diagnóstico precoce da evolução para as formas graves e crônicas da esquistossomose é crítico para o controle da morbimortalidade associada à doença, a detecção de miRNAs em pacientes infectados pelo *S. mansoni* e, como os miRNAs são extremamente estáveis na circulação, estes vem sendo indicados como potenciais marcadores para infecção, avaliação da morbidade e, também, como critério de avaliação de cura pós terapia específica. Devido à expressão e o envolvimento de miR-182 e miR-10a no processo fibrogênico da esquistossomose hepática, como também a indicação de regularem o mRNA das citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$ , respectivamente, com papel na FPP, esses dois miRNAs foram selecionados para o estudo de biomarcadores moleculares na morbidade pelo *S. mansoni* e acompanhamento pós-terapêutico nos pacientes.

O papel do miRNAs na patologia causada pelo *S. mansoni* permanece ainda não esclarecido e a elucidação da base molecular da patologia pode indicar novos alvos de diagnóstico da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico (CHENG; JIN, 2012; LIU et al., 2016; ZHU et al., 2014).

### 2.3.4 Biomarcadores na detecção de fibrose hepática

A avaliação da presença e gravidade da fibrose hepática é de primordial importância na determinação das estratégias de tratamento, acompanhamento da resposta do paciente à terapia adotada, prognóstico, monitoramento das formas clínicas e do risco potencial para o desenvolvimento de complicações em pacientes com doença hepática crônica (SCOTT; GUHA, 2014), como a esquistossomose mansoni.

A US é uma ferramenta importante na avaliação das alterações hepáticas relacionadas à esquistossomose, porém, requer a disponibilidade do equipamento e operadores treinados. Esses entraves promoveram pesquisas na tentativa de identificar biomarcadores para prever a presença de fibrose e avaliar a sua intensidade.

Um biomarcador é definido como aquele que apresenta como característica o objetivo de medir e avaliar como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP, 2001). Essas características têm um maior significado na hepatologia, pois há falta de sintomas objetivos durante os estágios iniciais da doença e também devido a grande maioria das pessoas com doença hepática desconhecer o diagnóstico (SCOTT; GUHA, 2014).

Um teste ideal para a fibrose deve ser fácil de executar, ter baixo custo e ser confiável, proporcionando uma avaliação precisa dos graus de fibrose. A disponibilidade de um teste não invasivo permitirá o exame de mais indivíduos, permitindo avaliar os pacientes em um ambiente não especializado, como por exemplo, em unidades de saúde, e ainda podem apresentar o benefício econômico ao reduzir os custos no diagnóstico da morbidade hepática (SCOTT; GUHA, 2014), em comparação ao custo da realização do exame de US nos pacientes esquistossomóticos, no contexto da doença abordada.

Diversos estudos com marcadores não-invasivos, não somente para o diagnóstico da fibrose, mas para diferenciar os graus de fibrose em distintas doenças hepáticas, como hepatite B e C, cirrose e esteatose hepática, foram desenvolvidos. Esses marcadores foram usados em combinação para formação de escores de risco para fibrose, como o FibroTest e ActiTest (POYNARD et al., 2002, 2003, 2004, 2005), APRI (WAI et al., 2003), Forns índice (FORNS et al., 2002), Hepascore (ADAMS et al., 2005), FIB-4 (STERLING et al., 2006), APRG (WANG et al., 2017), dentre outros.

Na doença hepática causada pelo *S. mansoni*, diferentes biomarcadores (citocinas, plaquetas, marcadores séricos e moleculares) têm sido estudados e relacionados na

participação do processo fibrogênico da FPP (BUCHARD et al., 1998; CABANTOUS et al., 2017; DOMINGUES et al., 2011; HOY et al., 2014; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; MARINHO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014; MORAIS et al., 2010; RICARD-BLUM et al., 1999).

Entretanto, estudos entre a relação de biomarcadores com a fibrose hepática na esquistossomose é considerado pequeno quando comparada aos estudos com hepatopatias de outras etiologias e a maioria dos escores foram desenvolvidos e testados em pacientes infectados pelo HCV e sua extrapolação para outras doenças fibrogênicas deve ser considerada com cautela (SCOTT; GUHA, 2014). Apresentando um promissor campo de estudo no desenvolvimento de métodos não invasivos para a FPP.

O presente grupo de pesquisa realizou um estudo com o objetivo de desenvolver um índice biológico que fosse capaz de prever a presença de FPP nos pacientes com diagnóstico de esquistossomose mansoni. Uma população com 116 indivíduos, provenientes de ambulatório de hospital de referência para a doença em Pernambuco, foi avaliada e resultados promissores foram encontrados. Com os biomarcadores fosfatase alcalina e plaquetas foi desenvolvido um índice biológico que apresentou excelente acurácia na predição da FPP avançada nos pacientes avaliados (BARRETO et al., 2017).

Dessa forma, a verificação deste índice em indivíduos de área endêmica para a esquistossomose segue como uma continuação do estudo prévio realizado com o objetivo de validar a utilização do índice na verificação da presença de FPP avançada e progressão da doença para as formas crônicas e graves em população de campo. Em continuação à pesquisa de biomarcadores, o estudo da expressão de miRNAs e sua relação com a regulação de mRNA de citocinas envolvidas no processo fibrogênico, contribui para a elucidação da base molecular da patologia da esquistossomose, e poderá indicar novos alvos para avaliação da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico dos pacientes.

#### **2.4 Diagnóstico e tratamento da esquistossomose**

O diagnóstico da esquistossomose pode ser feito através do exame clínico-epidemiológico ou laboratorial. Os sinais e sintomas característicos da doença podem sugerir o seu diagnóstico clínico juntamente com os dados epidemiológicos do paciente, como histórico de exposição (contato com águas que contenham caramujos) e ser procedente de uma área endêmica. Entretanto, a esquistossomose pode ser confundida com outras doenças

em função das diferentes manifestações que ocorrem durante a sua evolução, tendo o diagnóstico confirmado através de exames específicos (BRASIL, 2014).

Uma variedade de técnicas de diagnóstico foi desenvolvida para a detecção da esquistossomose nas últimas décadas, que vão desde a detecção microscópica básica até abordagens moleculares sofisticadas. As estratégias de diagnóstico atuais podem ser agrupadas em quatro categorias principais: parasitológico direto, testes imunológicos, detecção de DNA e RNA, e citocinas, metabólitos e outras moléculas do *Schistosoma* como biomarcadores (UTZINGER et al., 2015; WEERAKOON et al., 2015).

O encontro dos ovos do parasito nas fezes do paciente através do exame parasitológico pela técnica quantitativa de Kato-Katz é o método recomendado pela OMS nas ações de rotina dos programas de controle da esquistossomose, permitindo também avaliar a intensidade da infecção (COLLEY et al., 2014).

O diagnóstico imunológico inclui testes que detectam anticorpos ou antígenos circulantes do *Schistosoma* no plasma ou soro do hospedeiro. Uma série de testes já foi formulado, como ELISA, imunofluorescência, teste intradérmico (UTZINGER et al., 2015). Apesar de apresentarem pouco valor no diagnóstico da doença devido à ocorrência de reações cruzadas com outras helmintoses, não se correlacionarem com a intensidade da infecção, permanecerem positivos após a cura do paciente e pela dificuldade de execução, são indicados nos casos em que testes parasitológicos são negativos em indivíduos com infecção leve e no diagnóstico de viajantes, emigrantes e pessoas expostas ocasionalmente (ALARCON et al., 2007; INFURNARI et al., 2017). O progresso dos métodos imunológicos abriu um campo para o desenvolvimento e uso de testes rápidos menos laboriosos que são úteis em comunidades e serviços de saúde de áreas endêmicas (FERREIRA et al., 2017).

A detecção de DNA ou RNA do *Schistosoma* por meio de técnicas mais avançadas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um complemento promissor ao diagnóstico parasitológico e sorológico da esquistossomose (WEERAKOON et al., 2015). Técnicas moleculares e diferentes DNA alvos foram descritos com especificidade de 100% (VERWEIJ; STENSVOLD, 2014). As técnicas moleculares apresentam como vantagem a possibilidade de detectar DNA ou RNA do parasito em diferentes tipos de amostras e ser altamente específica, entretanto, é pouco utilizada no diagnóstico da esquistossomose por exigir equipamentos caros e pessoal altamente qualificado, sendo seu uso restrito nas pesquisas científicas e serviços de referência (van LIESHOUT; ROESTENBERG, 2015).

A morbidade da esquistossomose persiste mesmo depois que os ovos não são mais detectáveis nas fezes. Isso destaca a importância do diagnóstico precoce da doença para prevenir ou reverter o progresso da fibrose hepática.

Diferentes métodos foram desenvolvidos e empregados para identificar as lesões provocadas pelo *S. mansoni* particularmente no fígado e sistema porta, métodos como a biópsia hepática (DIMMETTE, 1955), exame de ultrassom (US) do abdômen (PINTO-SILVA et al., 2010; RICHTER et al., 2016), marcadores biológicos (CORREIA et al., 2009; LAMBERTUCCI et al., 2007; MEDEIROS et al., 2014; SILVA et al., 2011) e, mais recentemente, a medição da rigidez hepática (elastografia) (VEIGA et al., 2017).

Atualmente, um dos métodos mais empregados no diagnóstico de morbidade e da FPP em pacientes esquistossomóticos é o exame US do abdômen superior. Através da US é possível analisar: a superfície hepática, o tamanho dos lobos direito e esquerdo do fígado (indicando presença ou ausência de hepatomegalia), o volume do baço (esplenomegalia), os diâmetros das veias porta e esplênica, o estágio da FPP e os sinais de hipertensão portal (circulação colateral e ascite), permitindo avaliar a extensão, evolução e possível regressão da doença após seu tratamento (PINTO-SILVA et al., 2010).

A avaliação ultrassonográfica para o diagnóstico da FPP é composta por uma graduação subjetiva (análise qualitativa, comparando-se o fígado examinado com padrões de acometimento pela fibrose) e objetiva (análise quantitativa, medindo-se a espessura da FPP). A análise qualitativa é obtida através da classificação de Niamey (RICHTER et al., 2001, 2016), a qual considera seis padrões de FPP denominados: A (ausência de fibrose); B (duvidosa); C (periférica); D (central); E (avançada) e F (muito avançada). Já a análise quantitativa é realizada de acordo com a classificação do Cairo (CAIRO WORKING GROUP, 1992), na qual a FPP é ordenada em três graus através da média de espessura do tecido fibrótico encontrado: grau I – leve ( $> 3$  a  $< 5$  mm); grau II – moderada ( $> 5$  a  $< 7$  mm); grau III – severa ( $> 7$  mm).

Apesar da ampla utilização da US no diagnóstico e acompanhamento da esquistossomose, seu uso apresenta algumas limitações: requer a disponibilidade do aparelho de ultrassom, necessidade de um examinador treinado para o diagnóstico da doença; variação inter-examinador, sendo considerado um procedimento examinador-dependente; não está acessível em todos os centros, principalmente nos menores que estão situados em áreas urbanas e rurais endêmicas (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007; MEDEIROS et al., 2014).

Como resultado dessas limitações, estudos surgiram abrindo um importante campo de pesquisa na tentativa de desenvolver métodos diagnósticos não invasivos através de biomarcadores com potencial para prover um método sensível e custo efetivo na avaliação do grau/estágio da fibrose hepática na esquistossomose humana.

O PCE, seguindo as orientações da OMS, recomenda o controle da esquistossomose através do tratamento dos portadores do parasito com o medicamento anti-helmíntico praziquantel (PZQ), devido à sua eficácia no combate à infecção e por sua contribuição para a redução da evolução da doença para as formas graves, refletindo na diminuição das morbidades associadas à esquistossomose (BRASIL, 2014).

O PZQ foi introduzido, em 1996, na rotina do PCE e atualmente é o único medicamento utilizado. É apresentado em comprimidos de 600 mg e administrado por via oral, em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças, e é administrado após uma refeição. O índice de cura aproxima-se de 80% para os adultos e de 70% para as crianças (BRASIL, 2014).

Estudos revelam que o tratamento com PZQ afeta os níveis das respostas imunológicas específicas na esquistossomose, através da ação direta matando os parasitas e expondo os seus antígenos ao reconhecimento da resposta imune (BOURKE et al., 2013).

Evidências também sugerem que a redução na intensidade da infecção pós-tratamento pode não reverter a morbidade relacionada à doença, porque algumas ocorrem em todos os graus de infecção, e algumas refletem danos permanentes no órgão atingido (ANDRADE et al., 2017). Este estudo realizou uma meta-análise com 71 estudos, avaliando os efeitos do tratamento com PZQ na morbidade da esquistossomose e obteve as seguintes estimativas de redução: hepatomegalia esquerda em 54%, hepatomegalia direita em 47%, esplenomegalia em 37%, fibrose periportal em 52%, diarreia por 53% e sangue nas fezes em 75%.

De acordo com as recomendações do MS para o PCE, após o tratamento dos portadores de *S. mansoni*, para avaliar a cura parasitológica, devem ser realizados três exames de fezes no quarto mês após o tratamento (BRASIL, 2014). Porém, devido ao diagnóstico considerado como “padrão-ouro” da infecção é a detecção de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro através do método de Kato-Katz, dificuldades relacionadas à baixa sensibilidade do exames pós-terapêutica específica, à baixa carga parasitária em alguns indivíduos, variação na oviposição do verme e à quantidade da amostra examinada, impossibilitam a confirmação da cura da infecção. Outro desafio é a frequente reinfecção da população continuamente exposta às coleções hídricas contaminadas com as cercarias do *S. mansoni* nos locais de

transmissão, devido à falta de medidas que promovam a mudança das condições sanitárias do ambiente (SIQUEIRA et al., 2017).

Dessa forma, é bastante incentivado tanto pelo MS bem como pela OMS, o estudo de biomarcadores para diagnóstico precoce da infecção, avaliação da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico que apresentem sensibilidade e especificidade para a doença. Para o estudo de biomarcadores moleculares pós-tratamento com o PZQ, optamos por avaliar os pacientes no primeiro, no terceiro e no sexto mês após o tratamento específico junto com a realização de exames parasitológicos de fezes, de acordo com proposta de Domingues (2010).

O presente estudo teve como objetivos: 1. validar o Coutinho-index como teste de triagem para avaliação da morbidade, através da predição de FPP avançada; 2. avaliar a expressão de miRNAs envolvidos no processo da fibrogênese hepática na esquistossomose antes e após o tratamento com PZQ.

### 3 JUSTIFICATIVA

Na esquistossomose mansoni, o fígado é o órgão mais afetado com a formação de fibrose nos espaços intraportais. A progressão da fibrose para os estágios mais avançados pode evoluir a doença para as formas mais graves e levar o paciente ao óbito.

A doença é considerada negligenciada e no Brasil é responsável por uma média de 500 óbitos anuais. O diagnóstico da morbidade apresenta-se de grande valor para verificar seu estágio e progressão nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Para um diagnóstico completo, a avaliação da presença e gravidade da fibrose periportal é de primordial importância na determinação das estratégias de tratamento, acompanhamento da resposta do paciente à terapia adotada, prognóstico, monitoramento das formas clínicas e do risco potencial para o desenvolvimento da forma grave hepatoesplênica e suas complicações.

O estudo de potenciais biomarcadores (isolados ou em conjunto) e do seu envolvimento no processo fibrogênico da esquistossomose visa contribuir para o entendimento da evolução da patogenia e apresentam-se como uma ferramenta promissora para o diagnóstico e avaliação da fibrose periportal em populações endêmicas, continuamente expostas ao risco de transmissão da esquistossomose e com pouco acesso às técnicas de diagnóstico mais sofisticadas, como o exame de ultrassom.

O desenvolvimento de um novo método de diagnóstico não-invasivo visa contribuir para um diagnóstico mais rápido da evolução da doença para as formas graves, através da predição da presença de fibrose periportal avançada. A utilização do Coutinho-index tem como proposta contribuir para a triagem de possíveis casos de evolução para as formas graves da esquistossomose nas próprias áreas endêmicas, através da solicitação de dosagem dos marcadores que compõem o índice, os quais são de fácil realização, baixo custo e estão disponíveis nos pequenos laboratórios de áreas endêmicas. Contribuindo para o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico precoce da esquistossomose mansoni com alterações hepáticas.

Além disso, o estudo de marcadores moleculares, como o miR-10a e miR-182 que possam estar associados com a regulação da expressão gênica do processo fibrogênico na esquistossomose, visa contribuir para a elucidação da base molecular da patologia, e poderá indicar novos alvos de diagnóstico e terapêuticos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Estudar os marcadores biológicos para o diagnóstico da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico em pacientes com esquistossomose mansoni.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar o padrão de fibrose periportal nos pacientes estudados através da ultrassonografia;
- b) Dosar os níveis séricos de fosfatase alcalina e o número de plaquetas de pacientes esquistossomóticos;
- c) Validar o índice biológico – Coutinho-index – para o diagnóstico da fibrose periportal como apoio na triagem dos casos crônicos e graves da esquistossomose mansoni em áreas endêmicas do estado de Pernambuco;
- d) Identificar e quantificar os microRNAs (miR-10a e miR-182) em pacientes com os diferentes padrões de fibrose periportal antes e após 30, 90 e 180 dias do tratamento com praziquantel;
- e) Avaliar e associar a expressão gênica dos mRNAs de IFN- $\gamma$  e IL-13 com a expressão dos miRNAs miR-10a e miR-182, respectivamente em pacientes com os diferentes padrões de fibrose periportal da esquistossomose antes e após 30, 90 e 180 dias do tratamento com praziquantel.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho de estudo

O presente trabalho foi dividido em duas etapas principais, na primeira foi realizada a validação do Coutinho-index, seguindo a classificação proposto por Sackett e Haynes (2002) de teste diagnóstico na fase III. Nesta fase é verificado se o resultado do teste diferencia pacientes com e sem o diagnóstico entre aqueles que seriam os suspeitos de apresentarem o mesmo. Realizando a análise em comparação com o padrão de referência para verificar quanto o teste é capaz de diagnosticar o alvo entre os suspeitos, devendo em todos os indivíduos envolvidos no estudo, ser realizado o diagnóstico considerado como “padrão ouro” e o novo método proposto. Foi selecionada uma amostra não probabilística de indivíduos com diagnóstico confirmado de esquistossomose e realizado o exame de ultrassom para a detecção da fibrose periportal nos pacientes selecionados.

Na segunda etapa foi realizado um estudo de coorte, através da análise de expressão de microRNAs, sendo elencando o ensaio da expressão gênica de miR-182 e miR10a, e a verificação da associação da expressão dos miRNAs com a expressão de mRNA alvos, como a IL-13 e IFN- $\gamma$ , respectivamente.

### 5.2 Local de estudo

Para a validação do índice biológico proposto, a seleção de pacientes foi desenvolvida no município de Jaboatão dos Guararapes, considerado como uma área endêmica de grande importância epidemiológica no estado de Pernambuco para a esquistossomose mansoni (SAUCHA et al., 2015). O município foi selecionado por ter se enquadrado nos seguintes critérios: a) realizar mais de 1.000 exames coprocópicos em um ano; e b) realizar o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) integrado com a atenção básica. Critérios baseados no estudo de Quinino e colaboradores (2010) a respeito do grau de implantação do PCE em municípios endêmicos de Pernambuco.

O município de Jaboatão dos Guararapes pertence à Região Metropolitana do Recife, situado cerca de 18 Km da capital do estado e ocupa uma área de 258,7 Km<sup>2</sup>. Segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2016 sua população era de 691.125 habitantes, sendo considerado o segundo município mais populoso de Pernambuco (IBGE, 2017).

Dentre as coleções hídricas existentes está a Lagoa do Olho D'Água (também chamada de Lagoa do Náutico), formada pelo afogamento dos rios que deságuam no litoral durante a última fase de avanço do mar (transgressão marinha) do período Holoceno. Bastante assoreada, esta lagoa sofre influência das marés, das enchentes do Rio Jaboatão e poluição por esgoto e lixo dos assentamentos localizados em seu entorno. Além disso, durante o ano observa-se uma grande quantidade de galerias entupidas, que jorram o esgoto para a rua e para as coleções hídricas da região (SOUZA et al., 2008).

Entre os anos de 2010 a 2016 foram registrados uma média de 315 exames parasitológicos de fezes positivos para *Schistosoma mansoni* por ano, apresentando uma positividade média de 3% (Tabela 1).

**Tabela 1** – Positividade para a esquistossomose mansoni no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, 2010-2016.

ANO	Nº de exames realizados	Nº de exames positivos	Positividade
2010	8.513	275	3,2%
2011	11.332	470	4,2%
2012	10.308	432	4,2%
2013	10.180	272	2,7%
2014	14.523	308	2,1%
2015	10.510	213	2%
2016	11.084	240	2,2%
<b>Média</b>	<b>10.921</b>	<b>315</b>	<b>3%</b>

Fonte: Elaborada pela autora a partir do banco de dados do SISPCE/SANAR/SES-PE

No período de setembro de 2015 a agosto de 2016 foram realizados 11 mutirões de US do abdômen superior para o diagnóstico da FPP e das formas clínicas da esquistossomose, em nove unidades de Programa de Saúde da Família (PSF) do município. Todas as unidades estão localizadas próximas à Lagoa do Olho D'Água (Figura 3), área reconhecida pelo encontro de caramujos do gênero *Biomphalaria* (SOUZA et al., 2008), e, portanto, considerada uma área de risco para a transmissão da esquistossomose.

**Figura 4** – Localização geográfica da Lagoa Olho D'Água e das Unidades de Saúde estudadas no município de Jaboatão dos Guararapes.



Fonte: elaborado pela autora através do Google Earth.

Nota: A estrela vermelha indica a localização da Lagoa Olho D'Água e a cruz amarela indica as unidades de saúde incluídas no estudo.

Devido à sazonalidade do período de chuva e possível transbordamento da Lagoa, optamos em realizar a segunda etapa da pesquisa em outro local, a fim de se evitar reinfecção ao *S. mansoni* dos indivíduos participantes do estudo.

Dessa forma, foi selecionada uma nova área, utilizando os seguintes critérios: a) ser considerada área endêmica para esquistossomose em Pernambuco; e b) apresentar importância epidemiológica com transmissão da doença em área urbana. Esse último critério levou em consideração que indivíduos de áreas urbanas têm menos risco de exposição ao parasito em comparação aos moradores de área rural.

A seleção de pacientes foi realizada no município de Escada, o qual foi elencado, pelo governo de Pernambuco, como área prioritária para o enfrentamento à esquistossomose (PERNAMBUCO, 2013, 2015). O município pertence à Região da Zona da Mata Norte, situado cerca de 62 Km da capital do estado, ocupa uma área de 342,2 Km<sup>2</sup> e esgotamento sanitário adequado em torno de 37%, com estimativas para 2017 de 68.281 habitantes (IBGE, 2018).

Entre os anos de 2011 a 2017 foram registrados uma média de 338 exames parasitológicos de fezes positivos para *Schistosoma mansoni* por ano, apresentando uma positividade média de 15,4% (Tabela 2).

**Tabela 2** – Positividade para a esquistossomose mansoni no município de Escada, Pernambuco, 2011-2017.

ANO	Nº de exames realizados	Nº de exames positivos	Positividade
2011	191	65	34%
2012	474	97	20,5%
2013	1.816	353	19,4%
2014	3.197	424	13,3%
2015	3.223	597	18,5%
2016	3.169	399	12,6%
2017	3.313	436	13,2
<b>Média</b>	<b>2.197</b>	<b>338</b>	<b>15,4%</b>

Fonte: Elaborada pela autora a partir do banco de dados do SISPCE/SANAR/SES-PE

No período de setembro de 2017 a janeiro de 2018 foram realizadas seleção de indivíduos com diagnóstico para esquistossomose, coleta sanguínea, exame de US e acompanhados após o tratamento específico por 30, 90 e 180 dias em dois PSF, localizados em área urbana do município.

### 5.3 Cálculo da amostra

Para o estudo da validação do Coutinho-index, o tamanho da amostra foi calculado utilizando uma fórmula de cálculo de amostra para avaliação de acurácia de testes (JONES et al., 2003) e considerando os seguintes parâmetros: prevalência de fibrose de 20%, sensibilidade do índice de 95%, especificidade de 80% e um intervalo de confiança de 0,05, obtendo-se um “n” total de 365 indivíduos.

Para o estudo dos microRNAs e seus mRNA alvos foi realizada uma seleção por conveniência durante o período de realização das coletas.

#### 5.4 População de estudo

Para o estudo de validação do Coutinho-index foi realizado um total de 445 exames de US nas unidades de saúde, dos quais, 379 (85,2%) indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 65 anos, com ovos de *S. mansoni* no exame parasitológico de fezes Kato-Katz, realizados através das ações de rotina do PCE e registrados no Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (SISPCE) do município de Jaboatão dos Guararapes, foram selecionados. Junto à coordenação do PCE municipal foi solicitado o encaminhamento desses pacientes aos PSF, como também de indivíduos com histórico epidemiológico da doença, residente das áreas consideradas endêmicas pelo município.

Para a análise da expressão e quantificação de microRNAs e mRNA alvo foram selecionados 12 indivíduos de ambos os sexos, com diagnóstico parasitológico de Kato-Katz positivo para ovos de *S. mansoni*, realizados no ano de 2017 nas ações do PCE e registrados no SISPCE do município de Escada. Os pacientes selecionados estavam positivos e sem tratamento específico no momento da coleta. Em todas as coletas pós-tratamentos, os indivíduos selecionados realizaram exame parasitológico através da técnica de Kato-Katz para verificação da ausência de reinfeção.

Após as avaliações clínica, ultrassonográfica e coleta sanguínea, os pacientes sem tratamento para a esquistossomose foram tratados com praziquantel 600mg (50mg/Kg), seguindo as recomendações do MS (BRASIL, 2014).

Os pacientes que apresentaram sinais e/ou sintomas de gravidade da doença foram encaminhados para o Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a fim de serem acompanhados adequadamente.

#### 5.5 Critérios de exclusão

Para a seleção da população do estudo foram considerados como critérios de exclusão dos pacientes: diagnóstico de hepatopatias de outras etiologias, detectadas pelo ultrassom do abdome ou sorologia positiva para hepatites do tipo B ou C; consumo abusivo de álcool (> 210g/semana); uso de fármacos hepatotóxicos; transplante de fígado; doença renal crônica e/ou pacientes esquistossomóticos esplenectomizados (MEDEIROS et al., 2014).

Para confirmação do critério de exclusão por hepatopatias de etiologia viral, todos os indivíduos selecionados para o estudo foram testados para hepatite B (anti-HBc e HBsAg) e

HCV (anti-HCV) no Laboratório do Departamento de Virologia/IAM- Fiocruz. Para detecção do anti-HBc foi realizado o método imunoenzimático competitivo através do kit bioelisa anti-HBc da Biokit, seguindo as instruções do fornecedor e para a detecção de HBsAg foi utilizado o teste rápido VIKIA® HBsAg, seguindo as instruções do fornecedor. Todas as amostras foram enviadas para o Laboratório de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE) para confirmação dos resultados. Para a confirmação do diagnóstico da hepatite C foi utilizado o kit Imuno-Rápido da WAMA Diagnóstica, seguindo as instruções do fornecedor. Dos pacientes incluídos na população de estudo para validação do Coutinho-index, seis foram excluídos por confirmação do diagnóstico para hepatite B e um pelo resultado positivo para o anti-HCV no teste rápido. Nenhum paciente da população de estudo do município de Escada apresentou resultados positivos nos testes rápido.

## **5.6 Ultrassonografia do abdômen superior**

Os indivíduos selecionados para compor a população de estudo foram encaminhados às unidades dos PSF da área de estudo para avaliação clínica e US de abdômen superior para caracterizar a forma clínica da doença, através da presença de hepatomegalia e/ou esplenomegalia e a verificação da presença ou ausência de fibrose periportal. A US foi realizada por médico gastroenterologista e especialista no diagnóstico por imagem da esquistossomose, integrante do grupo de pesquisa, com auxílio de equipamento Ultrason Portátil GE Healthcare, durante o período de seleção dos pacientes.

Para a classificação das formas clínicas dos casos crônicos de esquistossomose foram utilizados os seguintes critérios: Forma hepatointestinal (paciente sem esplenomegalia, com ou sem hepatomegalia e/ou com ou sem FPP, sem hipertensão portal); Forma hepática (indivíduo com hepatomegalia, FPP moderada ou avançada, sem hipertensão portal e sem esplenomegalia); Forma hepatoesplênica (paciente com baço aumentado, com diâmetro longitudinal acima de 12 cm), com hepatomegalia, com FPP moderada a avançada e com ou sem hipertensão portal).

Para caracterizar a FPP foi utilizada a classificação de Niamey (RICHTER et al., 2001), que identifica a fibrose em seis padrões: A – ausência de fibrose; B – fibrose duvidosa; C- fibrose periférica; D- fibrose central; E – fibrose avançada; F- fibrose muito avançada.

Os indivíduos participantes do estudo foram divididos em 3 grupos de acordo com o padrão FPP diagnosticados pela US.

- a) Pacientes sem fibrose - Formado por indivíduos com diagnóstico parasitológico positivo ou histórico epidemiológico de esquistossomose sem desenvolvimento de FPP, portanto, com padrões A e B na US;
- b) Pacientes com FPP moderada – Constituído por pacientes com diagnóstico parasitológico positivo ou histórico epidemiológico de esquistossomose e com FPP considerada moderada, padrões C e D na US;
- c) Pacientes com FPP avançada – Formado por indivíduos com diagnóstico parasitológico positivo ou histórico epidemiológico de esquistossomose e com diagnóstico de FPP avançada, padrões E e F, na US.

### **5.7 Dosagem dos biomarcadores do Coutinho-index**

Nos pacientes selecionados foram coletados, através do sistema vacutainer, 10 mL de sangue venoso para a realização das dosagens dos marcadores biológicos que compõem o índice em estudo e também para a pesquisa de marcadores virais para hepatites B ou C, no mesmo dia de realização da US. Os marcadores biológicos estudados foram a fosfatase alcalina (FA) e as plaquetas. Do sangue coletado, (10 mL) 5 mL foi sem anticoagulante, posteriormente centrifugado à 1500 xg para separação do soro utilizado na dosagem FA e marcadores virais, e 5 mL coletados com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para a quantificação do número de plaquetas.

A FA foi dosada no Laboratório do Departamento de Virologia/IAM- Fiocruz através do kit Fosfatase Alcalina da Labtest, seguindo as instruções do fornecedor. Este kit tem por finalidade a determinação da FA por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. Seus níveis séricos foram expressos como razão do valor obtido pelo limite superior de normalidade (LSN).

A contagem de plaquetas foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia/IAM- Fiocruz utilizando equipamento ABX Micros ES60 da Horiba, seguindo as instruções do fornecedor.

### **5.8 Coutinho-index**

Com os resultados dos exames laboratoriais (FA e plaquetas) e da confirmação dos critérios de exclusão foi aplicado o Coutinho-index em cada paciente, o qual apresenta a seguinte fórmula:  $FA/(LSN)/\text{plaquetas} \times 100$ .

O nome Coutinho-index foi em homenagem ao Professor Amaury Domingues Coutinho, um exemplo de um grande pesquisador e força motriz por trás de muita pesquisa na área de esquistossomose mansoni no Brasil, principalmente na nossa região.

### 5.9 Ensaio de expressão de microRNAs

Todas as coletas sanguíneas (pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias pós-tratamento) foram realizados utilizando tubo PAXgene Blood RNA (QIAGEN/BD Company), o qual contém um aditivo que estabiliza o perfil de transcrição genética *in vivo* reduzindo a degradação *in vitro* do RNA e minimizando a indução genética. Os procedimentos para coleta, transporte e armazenamento das amostras foram realizados seguindo as instruções do fornecedor.

Para a extração dos microRNAs e seus mRNA alvo foi utilizado *The PAXgene Blood miRNA* kit (QIAGEN/BD Company) a partir do sangue total coletado com os tubos PAXgene, seguindo as orientações do fabricante. RNA total > 18 nt (incluindo miRNA) é purificado das amostras de sangue estabilizadas utilizando tecnologia PAXgene de membrana de sílica. Os RNAs extraídos foram imediatamente armazenados no refrigerador -80°C até o momento da construção do DNA complementar (cDNA).

Anteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas utilizando a tecnologia de fluorométrica através do equipamento Qubit 3.0 e kits específicos para quantificação de RNA total e miRNAs (Thermo Scientific), com a finalidade de mensurar a concentração dos RNAs em cada amostra. A partir das concentrações obtidas, as amostras foram diluídas de acordo com as instruções do fabricante.

O passo seguinte consistiu na obtenção dos cDNAs através de primers específicos para cada gene e miRNAs estudados, seguindo as instruções do fornecedor com os kits TAQMAN *reverse transcription* e TAQMAN *microRNA reverse transcription* (Applied Biosystems, CA, USA), respectivamente.

Para a quantificação dos miRNAs foi utilizada a tecnologia TAQMAN MicroRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA) que possui sondas específicas e sensíveis para detecção de forma quantitativa dos miRNA (hsa-miR-10a [UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG] e hsa-miR-182 [UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU]). Para os genes IFN- $\gamma$  e IL-13 foi utilizada a tecnologia TaqMan® Gene Expression Assays (Hs 00989290\_g1 e Hs 00174379\_m1, respectivamente), seguindo as instruções do fabricante.

*Real-time* RT-PCR foi realizada no equipamento QuantStudio 5 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), sob as seguintes condições: 1 ciclo à 50°C por 2 minutos, 1 ciclo à 95°C por 10 minutos e 40 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 30 segundos. Para normalização foi utilizado a estratégia genes endógenos (SNU44 para os miRNAs e GAPDH para os mRNAs) e cálculo da expressão relativa através do método  $\Delta\Delta C_t$  pelo software expressionSuite v3.3 (Life Technologies, CA, USA).

### 5.10 Análise estatística

Para avaliar o desempenho do índice na predição da presença de FPP nos pacientes selecionados, foi realizada a análise dos resultados do cálculo do Coutinho-index em cada paciente no Laboratório de Métodos Quantitativos do Departamento de Saúde Coletiva (NESC) do CPqAM, utilizando-se o software R (The R Project for Statistical Computing, R Development Core Team) – versão 2.10 para análise dos resultados. Também foram avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, com intervalo de confiança de 95%. A acurácia do índice também foi avaliada pela curva *Receiver Operating characteristic* (ROC) e pelo cálculo da razão de verossimilhança para um resultado positivo do índice (LR+).

A análise estatística dos miRNAs foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism versão 6 para Windows. Para testar a suposição de homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk normality teste*. Para análise comparativa das variáveis foi utilizado o teste *Mann-Whitney* quando não observado o pressuposto de homogeneidade e quando foi observado o pressuposto de homogeneidade, foi utilizado o teste *Unpaired t teste*. Para a análise do pareamento das amostras foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. Os dados foram correlacionados utilizando-se o coeficiente de Spearman. Todas as conclusões serão baseadas considerando o erro alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 5.11 Aspectos éticos

A pesquisa para validação do Coutinho-index foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz-PE), com aprovação através do CAAE nº 32468214.0.0000.5190. Para a análise e expressão dos miRNAs também foi submetido ao CEP da mesma instituição e aprovação através do CAAE nº 50950615.9.0000.5190. Foi explicado aos participantes os objetivos da pesquisa e a

importância da doença na área de estudo. Todos os pacientes participaram do estudo após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com respeito às normas da resolução nº 466/2012 CNS/MS.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da população para validação do Coutinho-index

Foi realizado um total de 445 exames de US nas unidades de saúde, localizadas em torno do maior foco de transmissão da esquistossomose mansoni no município de Jaboatão dos Guararapes. Destas, 379 (85,2%) indivíduos foram considerados, através dos critérios de inclusão e exclusão do estudo, aptos para participação da pesquisa. Dos 379 indivíduos selecionados para o estudo, 141 (37,2%) eram do sexo masculino e 238 (62,8%) do sexo feminino. Com idade média de 42,6 ( $\pm$  15,2) anos.

Através do exame de US abdominal foram avaliados os padrões de FPP e a morbidade da doença nos indivíduos selecionados. Foi diagnosticado o padrão de FPP nos pacientes, dos quais 22 (5,8%) foram classificados com o padrão A e 19 (5%) com padrão B, formando o grupo sem FPP. No grupo de FPP moderada foram identificados, 215 (56,7%) indivíduos com padrão C e 77 (20,3%) com padrão D. Para o grupo classificados com FPP avançada foram 41 (10,8%) indivíduos com padrão E e 5 (1,3%) com padrão F (Tabela 3).

**Tabela 3** – Padrão de fibrose periportal identificado no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, 2015-2016.

Grupo	Padrão de fibrose periportal	N (%)	N (%)
1 (sem FPP)	A	22 (5,8%)	41 (10,8%)
	B	19 (4,9%)	
2 (FPP moderada)	C	215 (56,7%)	292 (77%)
	D	77 (20,3%)	
3 (FPP avançada)	E	41 (10,8%)	46 (12,1%)
	F	5 (1,3%)	
<b>Total</b>		<b>379 (100%)</b>	

Nota: FPP = fibrose periportal; A – ausência de fibrose; B – fibrose duvidosa; C – fibrose periférica; D – fibrose central; E – fibrose avançada; F – fibrose muito avançada; N = número de pacientes; % = frequência.

Também foi verificado o calibre da veia porta (VP) e o tamanho longitudinal do baço, apresentado diferenças significativas na comparação dos grupos de fibrose. Os pacientes sem FPP apresentaram uma média do calibre da VP de 0,99 ( $\pm$  0,13) cm, já nos os pacientes com FPP foi verificado 0,97 ( $\pm$  0,15) cm naqueles com FPP moderada e 1,07 ( $\pm$  0,28) cm com FPP avançada, com uma diferença de  $p = 0,01$  entre esses dois grupos. A medição do tamanho do baço longitudinal é importante para diagnosticar a forma hepatoesplênica da esquistossomose. Os pacientes sem FPP apresentaram uma média 9,12 ( $\pm$  1,14) cm, nos pacientes com FPP

moderada foi verificada uma média de 9,3 ( $\pm$  1,62) cm e naqueles com FPP avançada 11,3 ( $\pm$  4,01) cm. A análise estatística mostrou diferença significativa na comparação entre os grupos sem fibrose e FPP avançada ( $p = 0,04$ ) e entre os grupos de pacientes do FPP moderada e avançada ( $p = 0,001$ ).

Entre as formas clínicas da esquistossomose, um total de 253 (66,7%) casos entre os indivíduos estudados foram considerados crônicos para a doença. Destes, 154 (60,9%) foram diagnosticados com a forma hepatointestinal, 80 (31,6%) com a forma hepática e 19 (7,5%) casos foram identificados com a forma hepatoesplênica (Tabela 4).

**Tabela 4** – Forma clínica crônica identificada no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, 2015-2016.

<b>Forma crônica</b>	<b>N (%)</b>
Hepatointestinal	154 (60,9%)
Hepática	80 (31,6%)
Hepatoesplênica	19 (7,5%)
<b>Total</b>	<b>253 (100%)</b>

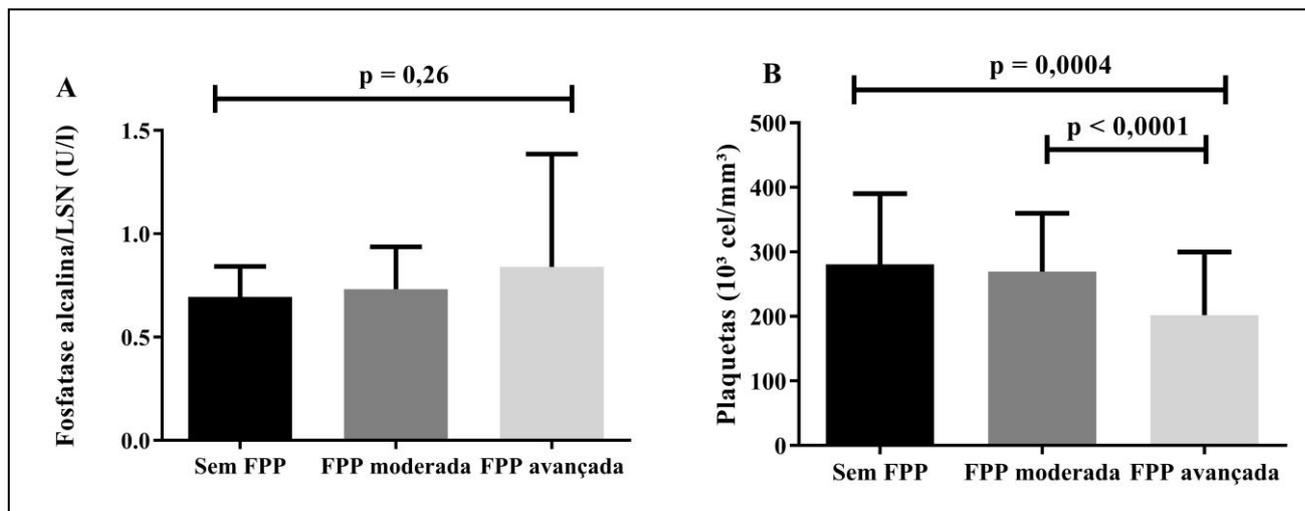
Nota: N = número de pacientes; % = frequência.

## 6.2 Relação entre níveis de fosfatase alcalina e o número de plaquetas com os graus de fibrose periportal

Os níveis séricos de FA(/LSN) variaram de 0,25 a 3,86 U/l, com média de 0,74 ( $\pm$  0,27) U/l nos indivíduos selecionados para o estudo. Em comparação aos padrões de fibrose, a média da concentração de FA foi de 0,69 ( $\pm$  0,14) U/l no grupo sem FPP, 0,73 ( $\pm$  0,20) U/l no grupo de FPP moderada e 0,83 ( $\pm$  0,54) U/l nos pacientes com FPP avançada. Entretanto não apresentou diferença significativa entre os grupos de FPP (Figura 5A).

Após a realização da contagem do número de plaquetas foi observada uma correlação negativa com os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansoni. O número de plaquetas variou de 22 a 675 ( $\times 10^3$  células/mm<sup>3</sup>), com média de 262 ( $\pm$  96,2) ( $\times 10^3$  células/mm<sup>3</sup>), nos indivíduos selecionados para o estudo. As médias do número de plaquetas nos grupos sem FPP, FPP moderada e FPP avançada foram 280, 269 e 201 ( $\times 10^3$  células/mm<sup>3</sup>), respectivamente. Pacientes com FPP avançada apresentaram uma significativa diminuição do número de plaquetas quando comparados aos pacientes com fibrose moderada e pacientes sem fibrose (Figura 5B).

**Figura 5** - Relação entre marcadores biológicos analisados com os grupos de fibrose periportal na população estuada.



Nota: (A) Fosfatase alcalina; (B) Plaquetas. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Mann-Whitney teste  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal; LSN = limite superior de normalidade; U/l = unidades/litro.

### 6.3 Coutinho-index na predição da fibrose periportal em população de área endêmica para a esquistossomose mansoni

Analisando a relação dos níveis de FA e do número de plaquetas com a FPP nos pacientes estudados, verificamos a relação dos dois marcadores, através do Coutinho-index, em prever a presença de FPP na população de campo estudada.

Em cada paciente foi aplicado o índice, variado de 0,10 a 14,8 e foi comparada a média entre os grupos de fibrose estudados. Nos pacientes esquistossomóticos diagnosticados sem FPP, o Coutinho-index apresentou uma média de 0,31 ( $\pm 0,21$ ). No grupo de pacientes com fibrose moderada foi verificada uma média de 0,31 ( $\pm 0,19$ ) do índice e no grupo de pacientes com FPP avançada, uma média de 0,83 ( $\pm 2,17$ ).

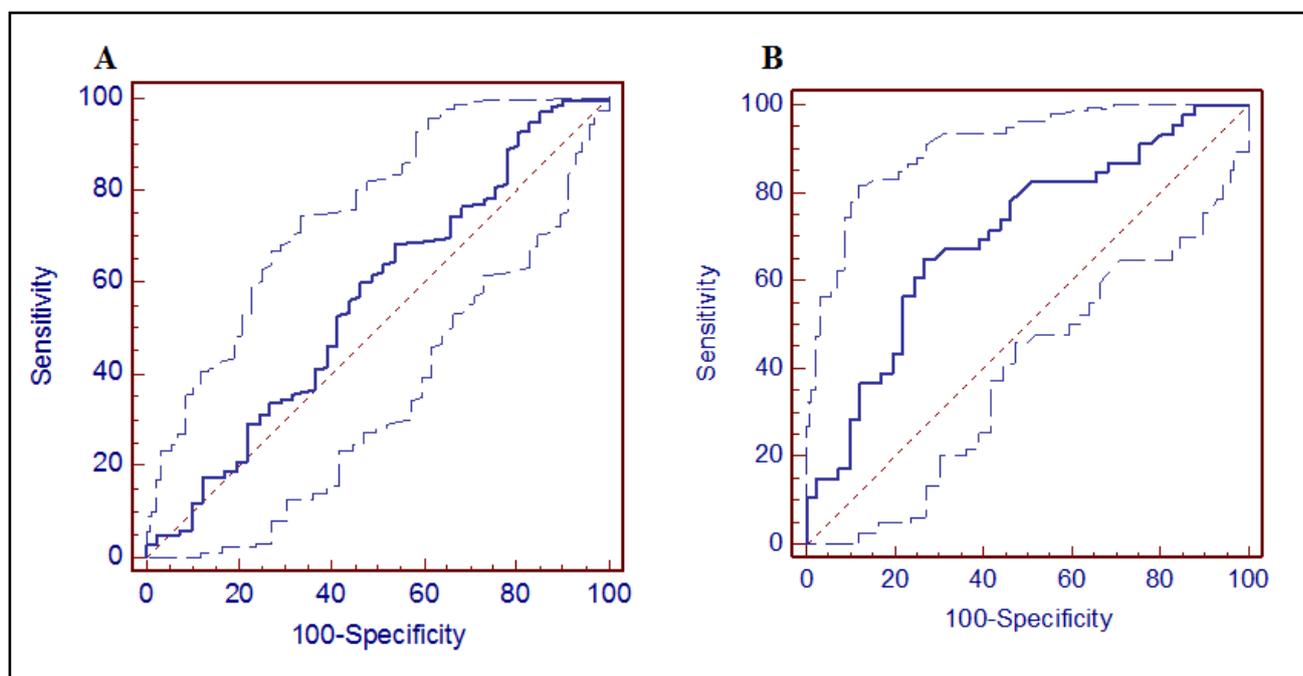
O Coutinho-index apresentou uma área abaixo da curva ROC de 0,55 (0,45 – 0,65) na predição da presença de FPP nos pacientes estudados, com um melhor desempenho em prever a presença de FPP avançada (Tabela 5 e Figura 6).

**Tabela 5** - Relação entre o Coutinho-index com os grupos de fibrose periportal na população estudada.

Grupos de FPP	p valor	AUC (IC – 95%)
Sem FPP x FPP moderada	0,45	0,55 (0,43 – 0,63)
Sem FPP x FPP avançada	0,0011	0,70 (0,59 – 0,81)
FPP moderada x avançada	< 0,0001	0,68 (0,60 – 0,77)

Nota: FPP = fibrose periportal; AUC = área abaixo da curva ROC; IC = intervalo de confiança.

**Figura 6** – Curvas ROC do Coutinho-index em diferentes grupos de fibrose periportal.



Nota: (A) Sem fibrose x presença de FPP; (B) Sem FPP x FPP avançada.

Baseados na curva ROC foram escolhidos dois *cut-off* para verificar a presença de FPP ( $> 0,228$ ) e confirmação da presença de FPP avançada ( $> 0,326$ ) na população estudada. O Coutinho-index mostrou ausência de fibrose em 19 (46,3%) dos pacientes sem fibrose e em 242 (71,6%) dos pacientes diagnosticados com fibrose moderada e avançada na US. Para confirmar a presença de fibrose avançada foi estabelecido o *cut-off* de  $> 0,326$  com uma área sob a curva ROC de 0,70, sensibilidade de 71,4% e especificidade de 70,7%, identificando FPP avançada em 30 (65,2%) dos pacientes com o mesmo diagnóstico na US (Tabela 6).

**Tabela 6** – Desempenho do Coutinho-index frente ao diagnóstico da fibrose periportal através da ultrassonografia em população de área endêmica para a esquistossomose mansoni.

Coutinho-index	Sem FPP (n = 41)		Com FPP (n = 338)		AAC	Sensibilidade	Especificidade	LR+
	n	%	n	%				
< 0,228	19	46,3	96	28,4	0,55	68,2%	46,3%	1,27
> 0,228	22	53,7	242	71,6				
	Sem FPP (n= 41)		FPP avançada (n = 46)		AAC	Sensibilidade	Especificidade	LR+
	n	%	n	%				
< 0,326	29	70,7	11	26,8	0,70*	71,4%	70,7%	2,66
> 0,326	12	29,3	30	65,2				
	FPP moderada (n = 292)		FPP avançada (n = 46)		AAC	Sensibilidade	Especificidade	LR+
	n	%	n	%				
< 0,326	208	71,3	11	26,8	0,68*	71,3%	70,5%	-
> 0,326	84	28,7	30	65,2				

Nota: FPP = fibrose periportal; AAC = área abaixo da curva ROC; LR = Likelihood ratio \* p < 0,05.

#### 6.4 Caracterização da população para expressão e quantificação de microRNAs

Foram selecionados 12 pacientes que apresentaram exame parasitológico positivo com uma média de 492 ( $\pm$  731,7) ovos/g de fezes e ainda não tinha realizado o tratamento com praziquantel. Destes, 7 (58,3%) eram do gênero masculino e 5 (41,7%) do gênero feminino, com idade média de 28,3 ( $\pm$  13,6) anos.

Através do exame de US abdominal foram avaliados os padrões de FPP e a morbidade da doença nos indivíduos selecionados. Foi diagnosticado o padrão de FPP nos pacientes, dos quais 2 (16,7%) foram classificados com o padrão A (ausência de FPP), 1 (8,3%) com padrão B (FPP duvidosa), formando o grupo sem FPP. No grupo de FPP moderada (C+D) foram identificados, 3 (25%) indivíduos com padrão C (FPP periférica) e 4 (33,3%) com padrão D (FPP central). Para o grupo classificados com FPP avançada (E+F) foram 2 (16,7%) indivíduos com padrão E (fibrose avançada) e nenhum paciente foi diagnosticado com padrão F (FPP muito avançada) (Tabela 7).

Entre as formas clínicas da esquistossomose, 10 (83,3%) indivíduos estudados foram diagnosticados com as formas crônicas da doença. Destes, 6 (60%) foram diagnosticados com a forma hepatointestinal e 4 (40%) com a forma hepática.

**Tabela 7** – Padrão de fibrose periportal identificado no exame de ultrassonografia do abdômen superior na população de Escada, Pernambuco 2017-2018.

<b>Grupo de fibrose periportal</b>	<b>Padrão de fibrose periportal</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
1 (sem FPP)	A	2 (16,7%)	3 (25%)
	B	1 (8,3%)	
2 (FPP moderada)	C	3 (25%)	7 (58,3%)
	D	4 (33,3%)	
3 (FPP avançada)	E	2 (16,7%)	2 (16,7%)
	F	0	
<b>Total</b>		<b>12 (100%)</b>	

Nota: FPP = fibrose periportal; A – ausência de fibrose; B – fibrose duvidosa; C – fibrose periférica; D – fibrose central; E – fibrose avançada; F – fibrose muito avançada N = número de pacientes.

### 6.5 Análise da expressão de RNAs (microRNAs e mRNAs)

Ao analisar a expressão dos RNAs foi observado, quanto aos miRNAs, que o miR-182 foi expresso 98% das 48 amostras analisadas e apresentou a menor média de Ct (27,4). A expressão do miR-10a foi quantificada em 77% das amostras analisadas e apresentaram um Ct médio de 33.

Com relação a expressão dos mRNAs dos genes IFN- $\gamma$  e IL-13, foi verificado em 87,5% e 12,5% das amostras, respectivamente. O gene de IFN- $\gamma$  apresentou um Ct médio de 34. Como a expressão do gene de IL-13 foi observada em poucas amostras e o Ct médio foi > 35, não foi possível realizar as demais análises e sua relação com a expressão de miR-182.

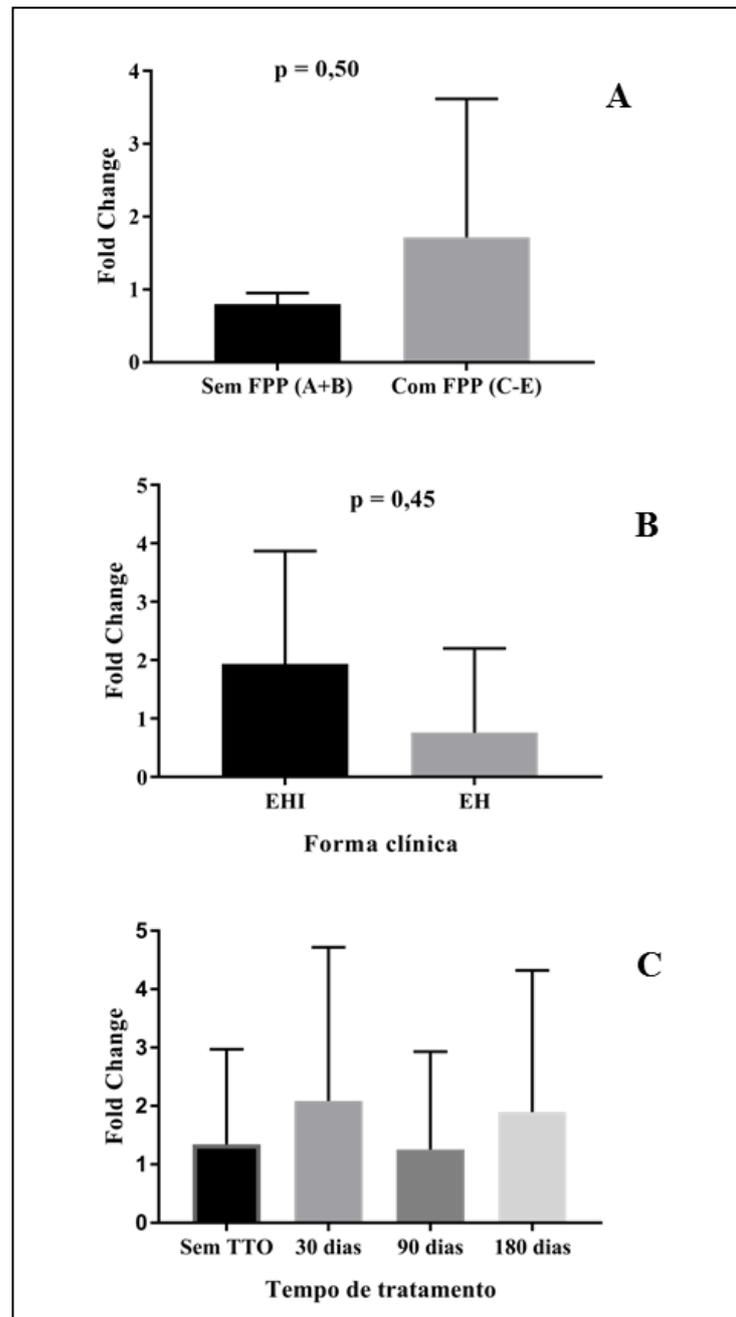
#### 6.5.1 Expressão e quantificação de miR-182

Os pacientes esquistossomóticos com presença de FPP moderada e avançada apresentaram uma maior expressão deste miRNA (Figura 7A) em comparação aos pacientes sem FPP (padrões A+B), entretanto não foi observada significância entre as médias de expressão dos dois grupos ( $p = 0,50$ ). Em pacientes com a forma clínica EHI, miR-182 foi mais expresso em comparação aos pacientes diagnosticados com a forma EH (Figura 7B), mas não apresentou diferença na comparação entre os grupos ( $p = 0,45$ ).

Também foi avaliada a expressão e quantificação do miR-182 antes do tratamento específico com PZQ e nos tempos, 30, 90 e 180 dias após. Os pacientes apresentaram uma maior expressão do miR-182 após 30 dias do tratamento (Figura 7C), porém não foi encontrada diferença estatística significativa entre os tempos de tratamento.

Ao correlacionar a quantificação deste miRNA em relação à carga parasitária e ao padrão de FPP foi observada uma correlação positiva significativa entre a quantidade de ovos/g de fezes com a expressão de miR-182 (Tabela 8).

**Figura 7** – Expressão do miR-182 em pacientes positivos para o *Schistosoma mansoni*.



Nota: *Fold change*: consiti no valor da expressão do gene normalizado na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado na amostra do grupo controle, para cada gen. (A) presença de FPP; (B) forma clínica da doença; (C) tempo de tratamento. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Mann-Whitney teste  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal; EHI = esquistossomose hepatointestinal; EH = esquistossomose hepática; TTO = tratamento.

**Tabela 8** – Correlação da expressão de miR-182 entre as variáveis analisadas na população estudada.

Variável	Spearman r	p- valor
Carga parasitária (nº ovos/g de fezes)	0,72	0,01
Padrão de FPP	0,04	0,89

Nota:  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal.

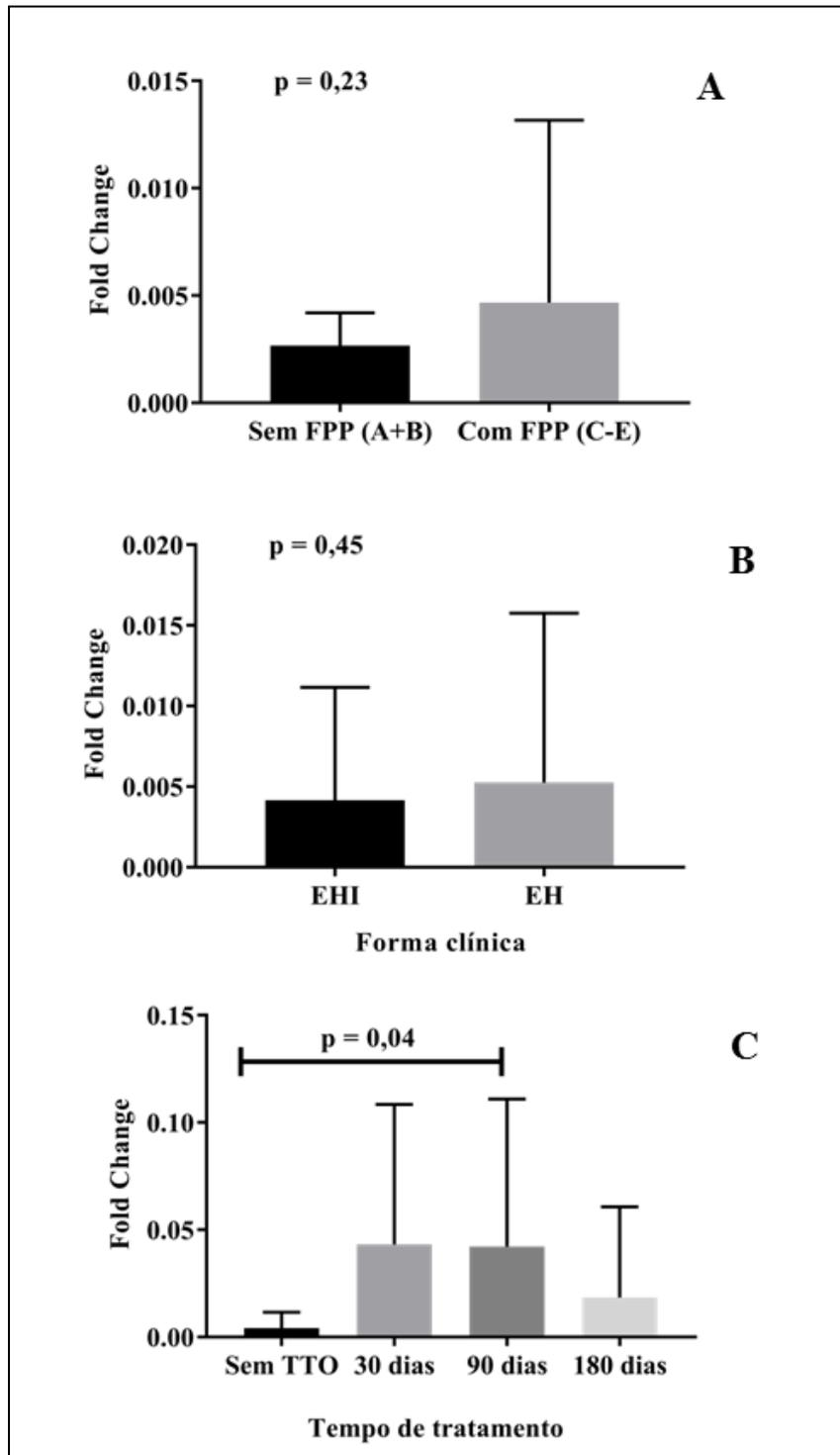
### 6.5.2 Expressão e quantificação de miR-10a

Não foi observada diferenças na quantificação da expressão deste miRNA em relação aos pacientes esquistossomóticos com ou sem a presença de FPP ( $p = 0,23$ ) nem entre as formas clínicas ( $p = 0,45$ ) diagnosticadas através do exame de US nos pacientes selecionados (Figura 8A;B).

Entretanto, na avaliação da expressão e quantificação do miR-10a antes do tratamento específico com PZQ e nos tempos, 30, 90 e 180 dias após, foi observada uma maior expressão do miR-10a nos pacientes após o tratamento, especialmente nos tempos 30 e 90 dias após a tomada do PZQ (Figura 8C).

Desta forma, foi realizada uma análise com o pareamento das amostras de cada paciente entre os tempos de tratamento para verificar a relação do aumento da expressão de miR-10a após a utilização do PZQ nos indivíduos infectados. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Não foi observada a correlação significativa entre a quantificação deste miRNA em relação à carga parasitária, padrão de FPP e a expressão dos mRNA do gene de IFN- $\gamma$  (Tabela 10). Entretanto, enquanto foi observada uma maior expressão de miR-10a após o tratamento nos pacientes analisados, a expressão gênica de IFN- $\gamma$  foi maior antes do tratamento com redução gradativamente em relação aos tempos pós-terapêuticos (Figura 9).

**Figura 8** – Expressão do miR-10a em pacientes positivos para o *Schistosoma mansoni*.

Nota: *Fold change*: consisti no valor da expressão do gene normalizado na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado na amostra do grupo controle, para cada gen. (A) presença de FPP; (B) forma clínica da doença; (C) tempo de tratamento. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Mann-Whitney teste  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal; EHI = esquistossomose hepatointestinal; EH = esquistossomose hepática; TTO = tratamento.

**Tabela 9** – Análise da expressão de miR-10a em amostras pareadas antes e após o tratamento com praziquantel nos indivíduos diagnosticados com esquistossomose mansoni.

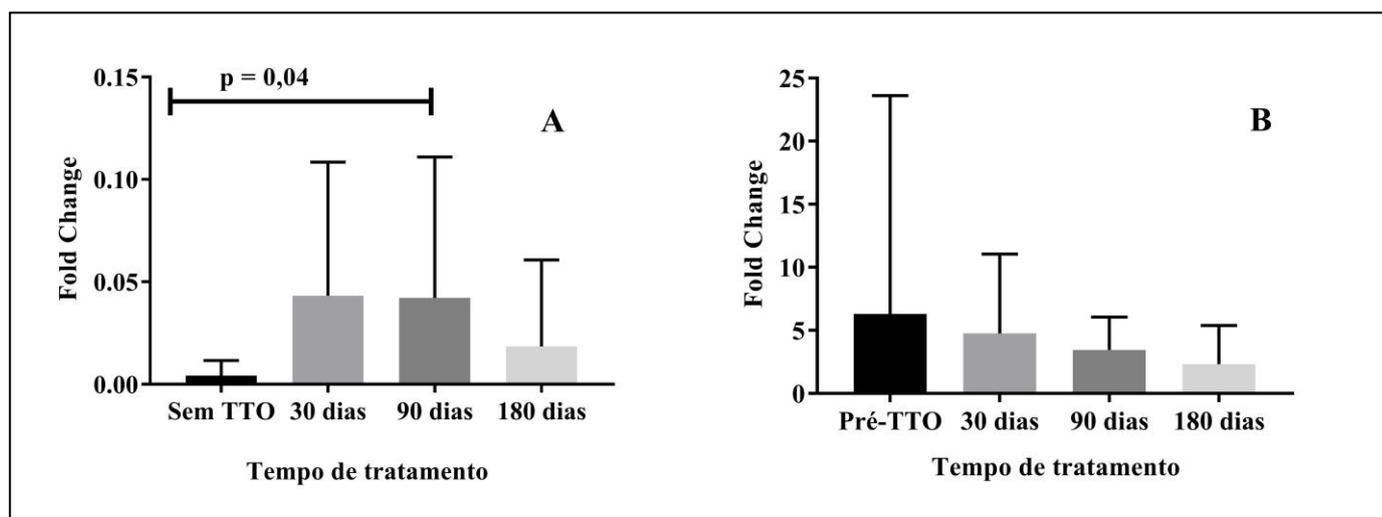
Tempos de tratamento	p- valor
Pré-TTO x 30 dias	0,01
Pré-TTO x 90 dias	0,01
Pré-TTO x 180 dias	0,04
30 dias x 90 dias	0,48
30 dias x 180 dias	0,01
90 dias x 180 dias	0,0039

Nota: Wilcoxon test.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. TTO = tratamento.

**Tabela 10** – Correlação da expressão de miR-10a entre as variáveis analisadas na população estudada.

Variável	Spearman r	p- valor
Carga parasitária (nº ovos/g de fezes)	-0,14	0,34
Padrão de FPP	-0,28	0,21
Expressão de IFN- $\gamma$	-0,47	0,08

Nota:  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal

**Figura 9** – Expressão do miR-10a e INF- $\gamma$  em pacientes positivos para o *Schistosoma mansoni*, antes e pós-tratamento com praziquantel.

**Nota:** *Fold change*: consiti no valor da expressão do gene normalizado na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado na amostra do grupo controle, para cada gen. (A) miR-10a; (B) mRNA INF- $\gamma$ . As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Mann-Whitney teste  $p < 0,05$  foi considerado significativo. FPP = fibrose periportal; EHI = esquistossomose hepatointestinal; EH = esquistossomose hepática; TTO = tratamento.

## 7 DISCUSSÃO

Diferentes pesquisas têm estudado biomarcadores não invasivos com a finalidade de desenvolver índices biológicos capazes de predizer a presença de fibrose hepática e diagnosticar o grau de fibrose em pacientes acometidos por diversas hepatopatias. A grande maioria dos índices foram desenvolvidos e testados em pacientes com doença hepática crônica, geralmente induzida pelo HCV, e alguns cuidados devem ser tomados quando se considera aplicá-los no diagnóstico da morbidade de outras doenças fibrogênicas hepáticas (GRESSNER et al., 2007).

Em estudo preliminar, o grupo de pesquisa trabalhou com uma população de pacientes de ambulatório hospitalar de referência para os casos graves de esquistossomose em Pernambuco e verificou que dois biomarcadores (FA e plaquetas), compondo um índice biológico, foram capazes de predizer e confirmar a presença de FPP avançada nesses pacientes com significativa acurácia (BARRETO et al., 2017). Assim, um dos objetivos do presente estudo foi validar o Coutinho-index na predição da fibrose hepática na esquistossomose mansoni em indivíduos proveniente de área considerada endêmica para a doença.

Na população selecionada para esta validação, indivíduos com padrões de FPP moderada (C+D) foram os mais detectados na área endêmica. Entre as formas crônicas da esquistossomose, as formas intermediárias, EHI e EH, são as mais encontradas nas populações das áreas de alta transmissão, sendo responsáveis por cerca de 90% dos casos da doença (PORDEUS et al., 2008). Assim, este fato contribuiu para uma maior detecção de indivíduos com os padrões C e D de FPP na população estudada.

Níveis séricos de FA e número de plaquetas foram associados com a morbidade da esquistossomose mansoni em estudos anteriores, entretanto, avaliados de forma isolada. A FA é uma enzima investigada nos testes de rotina da função hepática, com importância para avaliar anormalidades colestáticas e muito útil no diagnóstico complementar das doenças crônicas do fígado. Estudos realizados por Leite et al. (2013, 2015) com pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose, encontraram uma prevalência de FPP avançada em 54,5% dos pacientes e quando comparados à indivíduos saudáveis, os níveis séricos de FA apresentaram-se significativamente elevados ( $p < 0,0001$ ). Na esquistossomose, as alterações da via biliar intra-hepática, seja por lesões nos ductos causadas por reações aos antígenos liberados pelo ovo do parasito ou decorrentes da FPP, poderiam ser o substrato anatômico para o aumento dessa enzima (VIANNA et al., 1989).

A contagem do número de plaquetas tem sido utilizada como um indicador de gravidade da morbidade na esquistossomose, sendo sua redução numérica relacionada ao risco de hemorragia digestiva alta e à presença de hipertensão portal e padrões de FPP avançados (Al MOFARREH et al., 2003; CORREIA et al., 2009; el-SHORBAGY et al., 2004; SOUZA et al., 2000)

Um estudo envolvendo 47 pacientes hepatoesplênicos correlacionou o número de plaquetas com os diferentes graus de FPP e concluíram que a contagem de plaquetas é um promissor biomarcador na predição da FPP (LAMBERTUCCI et al. 2007). Em outro estudo com 122 pacientes os estágios mais avançados de FPP foram associados com os menores valores na contagem de plaquetas em comparação aos pacientes sem fibrose (MEDEIROS et al., 2014). Em concordância, também verificamos uma correlação negativa entre o número de plaquetas com os padrões de FPP diagnosticados na população de área endêmica estudada.

A avaliação não invasiva da fibrose hepática tem sido um dos campos de maior avanço na hepatologia na última década. Essa avaliação permite que sejam determinados o prognóstico, a necessidade de tratamento, a progressão da doença e a resposta ao tratamento em pacientes com doença hepática crônica. Assim, várias avaliações não invasivas foram desenvolvidas (FibroTest e ActiTest (POYNARD et al., 2002, 2003, 2004, 2005), APRI (WAI et al., 2003), Forns index (FORNS et al., 2002), Hepascore (ADAMS et al., 2005), FIB-4 (STERLING et al., 2006), APRG (WANG et al., 2017) e adotadas de acordo com diretrizes internacionais de manejo (EBRAHIMI et al. 2016). Entretanto, essa não é uma realidade na avaliação da fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos crônicos. A utilização de biomarcadores como potenciais preditores da FPP são escassos em comparação às outras etiologias causadoras de fibrose hepática. Apenas um estudo apresenta os resultados preliminares de índice biológico, específico para a FPP, como novo método capaz de prever a presença de FPP avançada em indivíduos com as formas crônicas da esquistossomose (BARRETO et al., 2017).

O Coutinho-index apresentado neste estudo mostrou significativa acurácia, uma vez que distinguiu pacientes com esquistossomose sem fibrose avançada daqueles com FPP avançada. O presente trabalho mostra os resultados alcançados na validação do Coutinho-index em uma população composta por indivíduos com histórico de exposição e infecção pelo *S. mansoni* com desenvolvimento e evolução para as formas crônicas e graves da doença em área considerada endêmica e de grande importância para a saúde pública no nordeste do Brasil. O Coutinho-index apresentou, em 65,2% dos indivíduos da população, o mesmo diagnóstico de FPP avançada no exame de US. A possibilidade de detectar precocemente a

evolução da doença para as formas mais graves proporciona uma importante medida para alcançar os objetivos estabelecidos pelo PCE (BRASIL, 2014) e, conseqüentemente, contribui para atingir as metas globais de eliminação da transmissão de forma duradoura e sustentável.

O Coutinho-index mostra-se como ferramenta promissora de triagem de possíveis casos de evolução para as formas graves da esquistossomose nas próprias áreas endêmicas, através da solicitação de dosagem dos marcadores de rotina que compõem o índice (FA e plaquetas), os quais são de fácil realização, baixo custo e possam estar disponíveis nos pequenos laboratórios de áreas endêmicas. Visando contribuir para um diagnóstico mais rápido da evolução da doença para as formas graves, através da predição da presença de FPP avançada.

Em uma análise comparativa entre os valores estabelecidos para os procedimentos ofertados Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, os exames para dosagem de FA e contagem de plaquetas representam 19,6% do valor para a realização de um exame de US do abdômen superior, necessário para diagnosticar e acompanhar o acometimento hepático em pacientes portadores da esquistossomose mansoni (BRASIL, 2018).

O presente estudo também objetivou analisar a expressão de dois miRNAs do hospedeiro humano, em pacientes infectados pelo *S. mansoni* e acompanhar essa expressão em diferentes tempos após o tratamento com o praziquantel. Os miRNAs escolhidos, miR-182 e miR-10a, foram demonstrados envolvidos no processo de desenvolvimento da fibrose hepática na esquistossomose (CABANTOUS et al., 2017; HUANG et al., 2018) e também foi observada uma maior expressão destes miRNAs, indicados na regulação da expressão de mRNA dos genes IL-4 e IFN- $\gamma$ , respectivamente (KELADA et al., 2013).

Foi verificado um aumento na expressão dos miRNAs estudados nos pacientes diagnosticados com FPP através da US em comparação aos pacientes esquistossomóticos sem a presença de fibrose. Entretanto, esse aumento não apresentou ser significativo na análise estatística. Uma das limitações do estudo foi a pequena amostra de pacientes sem FPP, que pode ter sido dificultada devido ao histórico de exposição dos indivíduos ao *S. mansoni* nas áreas consideradas endêmicas, com infecções anteriores que contribuem para a progressão da doença para as formas crônicas com o desenvolvimento de FPP.

Huang et al. (2018) investigaram o impacto de miR-182 na infecção pelo *S. japonicum* em induzir a fibrose hepática em modelos experimentais e em cultura de célula com hepatócitos humanos. Os autores verificaram que miR-182 foi altamente expresso em amostras de fibrose hepática. Em estudo realizado com amostras de tecido hepático e soro de pacientes com outras etiologias causadoras de fibrose hepática, como a hepatite C, os autores

encontraram uma maior expressão de microRNAs, em particular, o miR-182, o qual mostrou-se significativamente maior no tecido de biópsias hepáticas de pacientes com fibrose avançada (F3 e F4), quando comparados com as biópsias hepáticas de pacientes com fibrose precoce (F1 e F2) (VAN KEUREN-JENSEN et al., 2015).

Com a continuação da análise de miRNAs na infecção por este parasito, teremos a possibilidade de aumentar o tamanho da amostra e os grupos de comparação entre os padrões de FPP para verificar o envolvimento dos miR-182 e miR-10a na fibrose hepática pela esquistossomose no hospedeiro humano infectado.

No presente estudo foi observada uma correlação positiva significativa entre a carga parasitária do paciente e a expressão de miR-182. O surgimento de lesões e das formas clínicas da esquistossomose depende de fatores relacionados ao parasito como: cepa, fase evolutiva e intensidade da infecção; fatores intrínsecos do indivíduo: idade, estado nutricional, background genético e a resposta imunológica; como também a carga parasitária adquirida e a frequência de exposições (COLLEY et al., 2014; KATZ; ALMEIDA, 2003).

Modelos murinos infectados pelo *S. mansoni* demonstraram o miR-182 como o mais importante centro regulatório em células Th2-Foxp3<sup>+</sup>, influenciando nas vias de sinalização de citocinas locais, como as IL-2 e IL-4 (KELADA et al., 2013). As citocinas IL-13 e IL-4 têm atividades biológicas similares, sugerindo que elas compartilham um receptor comum (CALLARD; MATTHEWS; HIBBERT; 1996). Os genes dessas citocinas estão fisicamente próximos nos genomas humanos e de camundongos e existe homologia entre as sequências de aminoácidos de IL-13 e IL-4 (ZURAWSKI, DE VRIES, 1994). O perfil de citocinas Th2, tal como IL-4, IL-5 e IL-13 tem sido associado com a progressão da doença para os estágios crônicos e com um aumento no risco de desenvolver fibrose hepática severa na esquistossomose (CHUAH et al., 2014). Entre essas citocinas, a IL-13 no fígado está associada à progressão da fibrose, pois pode induzir a produção de colágeno, TGF- $\beta$  e outros genes associados à fibrose em células estreladas hepáticas (HAMMERICH; TACKE, 2014).

Avaliamos a expressão do miR-182 e sua relação com a regulação do gene de IL-13. Entretanto, a expressão gênica de IL-13 foi detectada em pouquíssimas amostras e nas que foram identificadas a expressão, o Ct estava muito alto. Segundo alguns autores, valores de Ct >35 são muitas vezes considerados background ou ruídos da técnica de qRT-PCR (BECKER et al., 2010; MESTDAGH et al., 2008). Devido à alta expressão de miR-182 e a possibilidade de regulação da expressão de IL-13, sugerimos que este miRNA pode estar incriminado na via *downregulation* da citocina, impedindo a formação/expressão do mRNA nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

Com relação à expressão do miR-10a nas amostras analisadas, não encontramos correlação deste miRNA com a carga parasitária dos pacientes no estudo. Entretanto, foi verificado um aumento da expressão após o tratamento específico com a droga de escolha, praziquantel, principalmente nos tempos 30 e 90 dias após o uso da medicação. Uma das hipóteses deste aumento pode ser devido à ação do PZQ no parasito, expondo um maior número de antígenos circulantes do *S. mansoni* reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro e desencadeando uma resposta com a promoção do aumento da expressão do miR-10a. Também verificamos que a expressão de IFN- $\gamma$  diminuiu após o tratamento com PZQ.

Apesar de não encontrar uma correlação significativa, consideramos o resultado como uma tendência e a possibilidade de aumentar o tamanho da amostra e os grupos de comparação entre os padrão de FPP, poderemos obter um resultado confirmatório da regulação da expressão do IFN- $\gamma$  pelo miR-10a em indivíduos com esquistossomose mansoni.

Cabantous et al. (2017) estudaram 22 amostras de tecido hepático de pacientes infectados com *S. japonicum* provenientes da China. Os indivíduos apresentaram fibrose avançada através do exame de US e os autores encontraram que os níveis do miRNA hsa-miR-10a estavam elevados nos pacientes em comparação às amostras de fígado de indivíduos controles.

Modelo experimental para o estudo da progressão da fibrose hepática foi avaliado, no qual verificou-se que, em comparação com o grupo de controle, a expressão de miR-10a foi significativamente aumentada no grupo com fibrose hepática em comparação com o grupo de controle. A quantidade de expressão de miR-10a estava maior no grupo de transfecção em comparação com o grupo controle e também foi demonstrado que a alta expressão de miR-10a melhorou significativamente a expressão de TGF- $\beta$ 1 e reduziu a expressão de Smad7 no grupo com fibrose hepática. Concluindo que a expressão de miR-10a foi alta em tecidos hepáticos de camundongos e, transfecção mimética de miR-10a promoveu significativamente a proliferação de células da fibrose hepática (ZHOU et al., 2016).

Ainda são poucos os estudos na literatura da relação do miR-182 e miR-10a na infecção pelo *S. mansoni* e seu papel na regulação do processo de formação da fibrose hepática. Apenas um estudo, em modelo murinho infectado pelo *S. mansoni*, que mostra a relação do aumento da expressão de miR-182 (KELADA et al., 2013) é encontrado nas bases científicas. Em relação ao miR-10a, também apenas um estudo no hospedeiro humano, porém infectado pelo *S. japonicum*, que apresenta a relação do aumento da expressão do miR-10a e sua relação com a fibrose hepática (CABANTOUS et al., 2017) é encontrado. Dessa forma, a

presente pesquisa mostra resultados inéditos, no hospedeiro humano, da relação do miR-182 com a carga parasitária na infecção pelo *S. mansoni* e do miR-10a com o tratamento específico com praziquantel na esquistossomose mansoni.

O estudo de diferentes tipos de biomarcadores envolvidos na patogênese da esquistossomose visa contribuir para um maior entendimento deste processo e pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico da fibrose periportal, tratamento e controle da doença, que permanece como um importante problema na saúde pública mundial, especialmente em nosso país.

Os resultados alcançados em uma população de campo apresentam o Coutinho-index como potencial candidato na triagem de pacientes crônicos esquistossomóticos com FPP avançada em áreas endêmicas e o estudo do envolvimento de miRNAs na patogenia da esquistossomose mansoni contribui para a elucidação dos mecanismos de progressão da doença para formas crônicas e graves, assim a detecção da expressão de miRNAs circulantes apresenta-se como potencial ferramenta para o desenvolvimento de novos alvos de diagnóstico e terapêuticos.

## 8 CONCLUSÃO

### 8.1 Coutinho index

- a) Foi capaz de detectar a presença de FPP e confirmar o diagnóstico de fibrose hepática avançada na maioria dos pacientes portadores da doença;
- b) Apresenta-se como uma nova ferramenta não invasiva, menos dispendiosa e mais acessível na triagem de pacientes com potencial evolução para as formas crônica e graves da esquistossomose em áreas endêmicas;
- c) Poderá auxiliar num diagnóstico precoce e intervenções efetivas para redução da morbimortalidade associados à esquistossomose mansoni.

### 8.2 miRNAs

- a) A expressão aumentada de miR-182 está relacionada à carga parasitária em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, sugerindo este miRNA como potencial marcador de progressão para as formas mais graves da doença;
- b) O tratamento com praziquantel, promove uma maior expressão de miR-10a em indivíduos com esquistossomose mansoni, sugerindo a presença de um alto estímulo antigênico até 90 dias pós tratamento com provável diminuição da resposta inflamatória ao parasita, através da regulação da expressão gênica de IFN- $\gamma$ .

## 9 PERSPECTIVA

- a) Mais estudos com a aplicação do Coutinho-index em áreas com diferentes graus de endemicidade da doença, na população pediátrica atingida pela esquistossomose e sua avaliação na rotina das ESF para o acompanhamento de pacientes são necessários para avaliar seu desempenho nos serviços de saúde;
- b) A continuação do estudo de biomarcadores moleculares com um número maior de pacientes infectados e com diferentes padrões de fibrose periportal poderá confirmar a participação dos microRNAs, miR-182 e miR-10a, na regulação de genes envolvidos no processo da fibrose hepática na esquistossomose mansoni, contribuindo na pesquisa de potenciais marcadores biológicos para o diagnóstico da morbidade e acompanhamento pós-terapêutico em pacientes com a doença;
- c) Realização de um ensaio funcional entre o miR-182 e a expressão de IL-13 para avaliar o papel deste miRNA na regulação gênica de citocinas fibrogênicas em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*;
- d) Além disso, temos como proposta avaliar a expressão de microRNAs específicos do *S. mansoni* nos pacientes com as diferentes formas clínicas crônicas e padrões de fibrose periportal antes e após 30 dias, 3 e 6 meses do tratamento com praziquantel como potenciais marcadores para infecção e critério de cura parasitológica pós terapia.

**REFERÊNCIAS**

- ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? Trends in Parasitology, Cambridge, v. 22, p. 85-91, Feb. 2006.
- ADAMS, L. A. et al. Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. Clinical Chemistry, Washington, DC, v. 51, n. 10, p. 1867-1873, Oct. 2005.
- ALARCON, B. N. et al. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria. The Venezuelan experience. Acta Tropica, Basel, v. 103, p. 41-49, Jul. 2007.
- ALMADI, M. A., et al. New insights into gastrointestinal and hepatic granulomatous disorders. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, London, v. 8, p. 455-466, Aug. 2011.
- AL MOFARREH, M. A., AL AKWAA, A. Y., AL MOFLEH, I. A. Gammaglutamyl transpeptidase activity in patients with schistosomiasis. The Saudi Journal of Gastroenterology, Riyadh, v. 9, p. 15-19, Jan. 2003.
- ALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis Mansoni in Humans. Infection and Immunity, Washington, v. 74, n. 2, p. 1215-1221, Feb. 2006.
- ANDRADE, G. et al. Decline in infection-related morbidities following drug-mediated reductions in the intensity of *Schistosoma* infection: A systematic review and meta-analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 11-23, Feb. 2017.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. Parasites & Vectors, London, v. 3, p. 60-67, Jul. 2010.
- ARANTES, L. G. et al. Regulação da abundância de miRNAs. In: PEREIRA, T. C. (Org.). Introdução ao mundo dos microRNAs. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. cap. 3, p. 65-81.
- AZEREDO, L. M. et al. Aspectos ultrassonográficos e hemodinâmicos da esquistossomose mansônica: avaliação pela ultrassonografia Doppler em áreas endêmicas. Radiologia Brasileira, São Paulo, v. 43, n. 2, 69-76, Mar/Abr. 2010.
- AZEREDO, L. M. Diagnóstico Diferencial: Cirrose x Esquistossomose. Ultrason Brasil: Boletim Informativo do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem Comissão de Ultrassonografia, São Paulo, ano 6, n. 10, p. 4-6, Ago. 2015. Disponível em: <<https://cbr.org.br/wp-content/uploads/2014/02/ultra-6-10.pdf>>. Acesso em: 10 Ago. 2017.
- BARBOSA, C. S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 549-554, Jul. 2010.

- BARBOSA, C. S. et al. The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 7, p. 878-883, Nov. 2011.
- BARBOSA, C. S. et al. Casos autóctones de esquistossomose mansônica em crianças de Recife, PE. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 684-690, 2013.
- BARBOSA, V. S. et al. First report of schistosomiasis on Serrambi beach, Ipojuca, State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Minas Gerais, v. 48, n. 6, p. 780-782, Nov./Dez. 2015.
- BARRETO, A. V. M. S. et al. Análise da positividade da esquistossomose mansoni em Regionais de Saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 24, n. 1, p. 87-96, Jan-Mar. 2015.
- BARRETO, A. V. M. S. et al. New index for the diagnosis of liver fibrosis in Schistosomiasis mansoni. Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 51-56, Jan./Mar. 2017.
- BARRETO, M. S., GOMES, E. C. S., BARBOSA, C. S. Turismo de risco em áreas vulneráveis para a transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 1-3, Mar. 2016.
- BARSOUM, R. S., ESMAT, G., EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. Journal of Advanced Research, Cairo, v. 4, n. 5, p. 433-444, Sept. 2013.
- BECKER, C. et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. Methods, San Diego, v. 50, n. 4, p. 237-43, Apr. 2010.
- BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clinical Pharmacology & Therapeutics, Washington, v. 69, n. 3, p. 89-95, Mar. 2001.
- BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human schistosoma mansoni infection is associated with low IL-10, low IFN- $\gamma$ , high TNF- $\alpha$ , or low RANTES, depending on age and gender. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1295-1303, Jan. 2004.
- BOURKE, C. D. et al. Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarization following treatment of human schistosomiasis. The Journal of Infectious Diseases, Oxford, v. 208, n. 1, p. 159-69, Jul. 2013.
- BRANDT, C. T. et al. Evaluation of the cytokines IL-10 and IL-13 as mediators in the progression of symmers fibrosis in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Rio de Janeiro, v. 37, n. 5, p. 333-337, Sept./Oct. 2010.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 32 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Pernambuco. 5. ed. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geo-helminthíases: plano de ação 2011-2015. Brasília, DF, 2012.

\_\_\_\_\_. Vigilância da esquistossomose mansoni. 4. ed. Brasília, DF, 2014. 144 p.

BRASIL. Departamento de Informática do SUS. Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS. Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/inicio.jsp>>. Acesso em: 01 maio 2018.

BUCHARD, G. D. et al. Schistosoma mansoni infection in a recently exposed community in Senegal: lack of correlation between liver morphology in ultrasound and connective tissue metabolites in serum. Tropical Medicine & International Health, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-241, Mar. 1998.

CABANTOUS, S. et al. Evidence for an important role of host microRNAs in regulating hepatic fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. International Journal for Parasitology, Netherlands, v. 47, n. 13, p. 823-830, Nov. 2017.

CAI, P. et al. Circulating miRNAs: potencial novel biomarkers for hepatology progression and diagnosis of schistosomiasis japonica in two murine models. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, 9 (7)e0003965, Jul. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0003965&type=printable>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

CAIRO WORKING GROUP. The use of diagnostic ultrasound in schistosomiasis – attempts at standardization of methodology. Acta Tropica, Basel, v. 51, n. 1, p. 45-63, May. 1992.

CALLARD, R. E.; MATTHEWS, D. J.; HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? Immunology Today, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 108-110, Mar. 1996.

CARACIOLO, M. F., MELO, D. S., QUININO, L. R. M. Avaliação normativa das ações dos enfermeiros da saúde da família no controle da esquistossomose em Pernambuco. Saúde em Debate, Rio de Janeiro, v. 40, n. 111, p. 153-168, Out-Dez. 2016.

CARVALHO, O. A. M. Mansonic neuroschistosomiasis. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, São Paulo, v. 71, n. 9B, p. 714-716, Sep. 2013.

CHENG, G.; JIN, Y. MicroRNAs: Potentially important regulators for schistosome development and therapeutic targets against schistosomiasis. Parasitology, Cambridge, v. 139, n. 5, p. 669-679, Apr. 2012.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. Trends in Parasitology, Cambridge, v. 30, n. 3, p. 141-150, Mar. 2014.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. Lancet, London, v. 383, n. 9936, p.: 2253–2264, Jun. 2014

- CORREIA, H. S. T. et al. Níveis séricos de globulinas e a intensidade da fibrose hepática em pacientes com esquistossomose mansônica. Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 194-8, Jul-Set. 2009.
- COSTA, C. S. et al. Programa de Controle da Esquistossomose: avaliação da implantação em três municípios da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Saúde em Debate, Rio de Janeiro, v. 41, p. 229-241, Mar. 2017.
- DeJESUS, A. R. et al. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. Infection and Immunity, Washington, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, Jun. 2004.
- DIMMETTE, R. M. Liver biopsy in clinical schistosomiasis; comparison of wedge and needle types. Gastroenterology, Bethesda, v. 29, p. 219-34, 1955.
- DOMINGUES, A. L. C., MEDEIROS, T. B., LOPES, E. P. A. Ultrasound versus biological markers in evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 7, p. 802-807, Nov. 2011.
- EBRAHIMI, H.; NADERIAN, M.; SOHRABPOUR, A.A. New Concepts on Pathogenesis, Diagnosis, and Targeting of Liver Fibrosis; A Review Article. Middle East Journal of Digestive Diseases, Tehran, v. 8, n. 3, p. 166-178, Jul. 2016.
- EL-SHORBAGY, E. et al. Non-invasive markers and predictors of severity of hepatic fibrosis in HCV patients at Sharkia Governorate, Egypt. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, Bethesda, v. 34, p. 459-478, Apr. 2004.
- ENK, M. J. et al. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p.537-40, Jul. 2010.
- ENTWISTLE, L. J.; WILSON, M. S. MicroRNA-mediated regulation of immune responses to intestinal helminth infections. Parasite Immunology, Oxford, v. 39, n. 2, p. 1-12, Feb. 2016.
- FERREIRA, F. T. et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni infection and evaluation of morbidity in a low-endemic area in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Minas Gerais, v. 50, n. 3, p. 358-364, May-Jun. 2017.
- FIGUEIREDO, A. L. et al. Receptor Antagonist of IL-13 Exerts a Potential Negative Regulation During Early Infection of Human Schistosomiasis. The Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 84, n. 5, p. 284-290, Nov. 2016.
- FORNS, X. et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. Hepatology, Baltimore, v. 36, p. 986-992, Oct. 2002.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. Gastroenterology, Baltimore, v. 134, n. 6, p. 1655-69, May 2008.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic Fibrosis: Emerging Therapies. Digestive Diseases, Basel, v. 33, n. 4, p. 504-7, Jul. 2015.

GIESECK, R. L.; WILSON, M. S.; WYNN, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. Nature Reviews Immunology, London, v. 18, n. 1, p. 62-76, Jan. 2008.

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

GOMES, E. C. S. et al. Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 822-834, Out-Dez. 2016b.

GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clinica Chimica Acta, Amsterdam, v. 381, n. 2, p. 107-113, Feb. 2007.

HAMMERICH, L.; TACKE, F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. Clinical and Experimental Gastroenterology, Auckland, v. 7, p. 297-306, Sep. 2014.

HENRI, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 169, n. 2, p. 929-936, Jul. 2002.

HOY, A.M. et al. Parasite-derived microRNAs in host serum as novel biomarkers of helminth infection. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-14, Feb. 2014.

HUANG, Y. et al. Effect of miR-182 on hepatic fibrosis induced by *Schistosomiasis japonica* by targeting FOXO1 through PI3K/AKT signaling pathway. Journal of Cellular Physiology, Philadelphia, v. 233, n. 10, p. 6693-6704, Oct. 2018.

INFURNARI, L. et al. The use of circulating cathodic antigen rapid test and serology for diagnosis of active schistosoma mansoni infection in migrants in Italy, a non-endemic country: a cross sectional study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 452-455, Jun. 2017.

IBGE. IBGE@idades. Jaboatão dos Guararapes. Disponível em: <<https://idades.ibge.gov.br/brasil/pe/jaboatao-dos-guararapes/panorama>> Acesso em: 10 ago. 2017.

IBGE. IBGE@idades. Escada. Disponível em: <<https://idades.ibge.gov.br/brasil/pe/escada/panorama>> Acesso em: 10 abr. 2018.

JIAO, J.; FRIEDMAN, S. L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 223-29, May 2009.

JONES, S. R.; CARLEY, S.; HARRISON, M. An introduction to power and sample size estimation. Emergency Medicine Journal, London, v. 20, n. 5, p. 453-458, Sep. 2003.

KAPOOR, S. Katayama syndrome in patients with schistosomiasis. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Haikou, v. 4, n. 3, p. 244, Mar. 2014.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43, Jan.-Mar. 2003.

KATZ, N. (Org.) Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76p.

KELADA, S. et al. miR-182 and miR-10a Are Key Regulators of Treg Specialisation and Stability during Schistosome and Leishmania-associated Inflammation. PLOS Pathogens, San Francisco, v. 9, n. 6, e1003451, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695057/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

KISSELEVA, T. The Origin of Fibrogenic Myofibroblasts in Fibrotic Liver. Hepatology, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 1039–1043, Mar. 2017.

KÖPKE-AGUIAR, L. A. et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to access severity of liver disease in schistosomiasis. Acta Tropica, Basel, v. 84, n. 2, p. 117-126, Nov. 2002.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; ANTUNES, C. M. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index and blood platelet count are good markers for fibrosis evaluation in schistosomiasis mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Minas Gerais, v. 40, n. 5, p. 599, Oct. 2007.

LEI, K. et al. The mecanismo and fuction of circular RNAs in human diseases. Experimental Cell Research, New York, v. 368, n. 2, p. 147-158, May. 2018.

LEITE, L. A. C. et al. Relationship between splenomegaly and hematologic findings in patients with hepatosplenic schistosomiasis. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 332-6, 2013.

LEITE, L. A. C. et al. Splenectomy improves hemostatic and liver functions in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. PloS ONE, San Francisco, v. 10, n. 8, e0135370, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4534302/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

LIU, W. Epigenetics in Schistosomes: What we know and what we need know. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Lausanne, v. 6, p. 1-9, Nov. 2016.

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

MANZELLA, A. et al. Schistosomiasis of the liver. Abdominal Imaging, New York, v. 33, n. 2, p. 144-150, Mar-Apr. 2008.

- MARINHO, C. C. et al. Serum hyaluronan and collagen IV as non-invasive markers of liver fibrosis in patients from an endemic area for schistosomiasis mansoni: a field-based study in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 471-78, Jul. 2010.
- MEDEIROS, T. B. et al. Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with schistosomiasis mansoni. Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v. 51, n. 1, p.34-8, Jan-Mar. 2014.
- MEDERACKE, I. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its a etiology. Nature Communications, London, v. 4, 2823, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059406/pdf/nihms-535216.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- MESTDAGH, P. et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. Nucleic Acids Research, Oxford, 36, n. 21, p. e143, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588502/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- MISKA, E. A. How microRNAs control cell division, differentiation and death. Current Opinion in Genetics & Development, London, v. 15, n. 5, p. 563–568. Oct. 2005.
- MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. Community Eye Health, London, v. 26, n. 82, p. 21–24, 2013.
- MORAIS, C. N. L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568, Set. 2008.
- MORAIS, C. N. L. et al. Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 460-66, Jul. 2010.
- O'CONNELL, R. M. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nature Reviews Immunology, London, v. 10, n. 2, p.111–122, Feb. 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro\\_relatorio\\_oms\\_doencas\\_tropicais.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro_relatorio_oms_doencas_tropicais.pdf)> Acesso em: 20 ago. de 2017.
- \_\_\_\_\_. Plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e ações pós-eliminação 2016-2022. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12276%3A2016-55th-directing-council-documents&catid=8811%3Adc-documents&Itemid=42078&lang=pt](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12276%3A2016-55th-directing-council-documents&catid=8811%3Adc-documents&Itemid=42078&lang=pt)> Acesso em: 20 ago. de 2017.
- \_\_\_\_\_. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. Disponível em: <

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259593/WER9249.pdf;jsessionid=473DB1B6E90EBCEF696AF49002D5BF67?sequence=1> (acessada em Agosto de 2017).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Epidemiological profiles of neglected diseases and other infections related to poverty in Latin America and the Caribbean. Washington, 2009. Disponível em: <<http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/nds-epi-profiles.pdf>>. Acesso em: 20 ago. de 2017.

\_\_\_\_\_. Report of the schistosomiasis regional meeting. Defining a road map towards verification of elimination of schistosomiasis transmission in the Latin America and the Caribbean countries by 2020. Washington, 2014. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=6157&Itemid=40770&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6157&Itemid=40770&lang=en)>. Acesso em: 20 ago. de 2017.

PAPAMATHEAKIS, D. G. et al. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. Pulmonary Circulation, Chicago, v. 4, n. 4, p. 596-611, Dec. 2014.

PEREIRA, T. C. (Org). Introdução ao mundo dos microRNAs. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 342p.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011/2014. Recife, 2013. 39p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

\_\_\_\_\_. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 - 2018 / Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2015. 46p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

\_\_\_\_\_. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA ESQUISTOSSOMOSE E GEOHELMINTÍASES. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, v. 5, mar. 2015. Disponível em: <[http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/boletim\\_vs\\_2015\\_final.pdf](http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/boletim_vs_2015_final.pdf)>. Acesso em: 20 ago. 2017.

PINTO-SILVA, R. A. et al. Ultrasound in schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 479-484, Jul. 2010.

PONTES, F. Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo. Revista Inovação em Pauta, Rio de Janeiro, v. 6, p. 69-73, Set. 2009.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. Epidemiologia e Serviços de Saúde Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-7, Jul-Set. 2008.

POYNARD, T. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. Journal of Viral Hepatitis, Oxford, v. 9, n. 2, p. 128-133, Mar. 2002.

- POYNARD, T. et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. Hepatology, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 481-492, Aug. 2003.
- POYNARD, T. et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. Clinical Chemistry, New York, v. 50, n. 8, p. 1344-1355, Aug. 2004.
- POYNARD, T. et al. FibroTest-FibroSURE: towards a universal biomarkers of liver fibrosis? Expert Review of Molecular Diagnostics, London, v. 5, n. 1, p. 15-21, Jan. 2005.
- QUININO, L. R. M.; BARBOSA, S. C.; SAMICO, I. O programa de controle da esquistossomose em dois municípios da zona da mata de Pernambuco: uma análise de implantação. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife, v. 10, n. 1, p. 119-129, Nov. 2010.
- QUITES, H. F. O. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose na Estratégia de Saúde da Família em municípios do Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 375-389, Abr-Jun. 2016.
- RICARD-BLUM, S. et al. Relationships between several markers of extracellular matrix turnover and ultrasonography in human schistosomiasis mansoni. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 60, n. 4, p. 658-663, Apr. 1999.
- RICHTER J. et al. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-56, Set. 2001.
- RICHTER, J. et al. Ultrasound assessment of schistosomiasis. Zeitschrift für Gastroenterologie, München, v. 54, n. 7, p. 53-60, Jul. 2016.
- ROSS, A. G. et al. Katayama syndrome. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, n. 3, p. 218-24, Mar. 2007.
- SACKETT, D.; HONES, R. B. The architecture of a diagnostic research. The British Medical Association, London, v. 324, p. 539-541, Mar. 2002.
- SAUCHA, C. V. V.; SILVA, J. A. M.; AMORIM, L. B. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco em 2012. Epidemiologia e Serviços em Saúde, Brasília, v. 24, n. 3, p. 497-506, Jul-Set. 2015.
- SETHI, S.; SETHI, S.; BLUTH, M. H. Clinical implication of microRNAs in molecular pathology: na update for 2018. Clinics in Laboratory Medicine, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 237-251, Jun. 2018.
- SILVA, C. C. et al. Schistosomiasis mansoni: ultrasound evaluated hepatic fibrosis and serum concentrations of hyaluronic HCID. Annals of Tropical Medicine and Public Health, London, v. 105, n. 3, p. 233-9, Apr. 2011.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no estado de Pernambuco, Brasil. Epidemiologia e Serviços em Saúde, Brasília, v. 20, n. 3, p. 327-336, Set. 2011.

SIQUEIRA, L. D. P. et al. Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies. Acta Tropica, Basel, v. 176, p. 179-187, Dec. 2017.

SCOTT, R.; GUHA, I.N. Non-invasive monitoring of liver fibrosis. British Medical Bulletin, London, v. 112, n. 1, p. 97-106, Dec. 2014.

SOUZA, M. A. A. et al. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Minas Gerais, v. 41, n. 3, p. 252-256, Mai-Jun. 2008.

SOUZA, M. R.; TOLEDO, C. F.; BORGES, D. R. Trombocytomia as a predictor of portal hypertension in schistosomiasis. Digestive Diseases and Sciences, New York, v. 45, n. 10, p. 1964-1970, Oct. 2000.

STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. Infection and Immunity, Washington, v. 72, n.1, p. 1-12, Jan. 2004.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. Hepatology, Baltimore, v. 43, n. 6, p. 1317-1325, Jun. 2006.

UTZINGER J. et al. New diagnostic tools in schistosomiasis. Clinical Microbiology and Infection, Paris, v. 21, n. 6, p. 529-542, Jun. 2015.

VAISHYA, S.; SARWADE, R. D.; SESHADRI, V. microRNA, proteins and metabolites as novel biomarkers for prediabetes, diabetes and related complications. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Lausanne, v. 9 (180), 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5925339/pdf/fendo-09-00180.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

van KEUREN-JENSEN, K. R. et al. microRNA changes in liver tissue associated with fibrosis progression in patients with hepatitis C. Liver International, Oxford, v. 36, n. 3, p. 334-343, Mar. 2016.

van LIESHOUT, L., ROESTENBERG, M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. Clinical Microbiology and Infection, Paris, v. 21, n. 6, p. 520-528, Jun. 2015.

VEIGA, Z. S. T. et al. Transient elastography evaluation of hepatic and spleen stiffness in patients with hepatosplenic schistosomiasis. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, London, v. 29, n. 6, p. 730-735, Jun. 2017.

VERWEIJ, J. J.; STENSVOLD, C. K. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. Clinical Microbiology Reviews, Washington, DC, v. 27, n. 2, p. 371-478, Apr. 2014.

VIANNA, M. R. et al. Intrahepatic bile duct changes in human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Liver, Copenhagen, v. 9, n. 2, p. 100-109, Apr. 1989.

WANG, J. et al. A novel predictive model using routinely clinical parameters to predict liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Oncotarget, New York, v. 8, n. 35, p. 59257-59267, Jul. 2017.

WAY, C. T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 518-526, Aug. 2003.

WEERAKOON, K. G. A. D. et al. Advanced in the diagnosis of human schistosomiasis. Clinical Microbiology Reviews, Washington DC, v. 8, n. 4, p. 939-967, Oct. 2015.

ZHOU, G. et al. MiR-10a improves hepatic fibrosis by regulating the TGF $\beta$ 1/Smads signal transduction pathway. Experimental and Therapeutic Medicine, Athens, v. 12, n. 3, p. 1719-1722, Sep. 2016.

ZHU, L.; LIU, J.; CHENG, G. Role of microRNAs in schistosomoses and schistosomiasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Lausanne, 4, 165, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4227527/pdf/fcimb-04-00165.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

ZURAWSKI, G.; VRIES, J. E. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. Immunology Today, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 19-26, Jan. 1994.

**APÊNDICE A - Artigo submetido**

Elsevier Editorial System(tm) for  
International Journal for Parasitology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: New biological index for the screening of patients with severe forms of schistosomiasis mansoni in endemic areas.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Key words: Schistosomiasis mansoni; hepatic fibrosis; alkaline phosphatase; platelet count; biological index.

Corresponding Author: Dr. Ana Barreto,

Corresponding Author's Institution: Oswaldo Cruz Foundation

First Author: Ana Barreto

Order of Authors: Ana Barreto; George Diniz; Ana Cavalcanti; Ana Domingues; Edmundo Lopes; Silvia Montenegro; Clarice Morais

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Context - Periportal fibrosis is the major pathological consequence of *Schistosoma mansoni* infection. Aim - Create and validate a simple biological index, called Coutinho-index, which consists of routine laboratory data to predict the intensity of periportal fibrosis in patients with schistosomiasis mansoni. Material and methods - 495 patients of both genders, aged 18-65 years, with previous history of the disease and/or positive parasitological examination were selected and divided into two cohorts: 1. hospital outpatients (n = 116) for the development of the biological index; 2. endemic patients (n = 379) for validation. Ultrasound was used as gold standard for periportal fibrosis pattern classification. Results - The model created in a multivariate analysis, involved alkaline phosphatase measurement and platelet count, which was able to predict advanced fibrosis in 82.1% of 495 patients. To prognosticate the presence of advanced fibrosis a cut-off of > 0.326 was established. The validation group had an area under the ROC curve of 0.70, sensitivity 65.2% and specificity 73.1%, identifying with the same diagnosis of the ultrasonography 2/3 (65.2%) of the patients. Conclusion - Coutinho-index was able to predict periportal advanced fibrosis in most patients. Therefore, it is presented as a new non-invasive, cheaper and more accessible tool in the screening of patients with the severe form of the schistosomiasis mansoni, especially in the endemic areas.

Suggested Reviewers: Virginia Lorena  
lorena@cpqam.fiocruz.br

Vlaurdia Costa  
vlaudiacosta@uol.com.br

Maria Silva  
silvamba@yahoo.com.br

## APÊNDICE B - Artigo publicado

ORIGINAL ARTICLE

AG-2016-57

[dx.doi.org/10.1590/S0004-2803.2017v54n1-10](https://doi.org/10.1590/S0004-2803.2017v54n1-10)

## New index for the diagnosis of liver fibrosis in *Schistosomiasis mansoni*

Ana Virgínia Matos Sá **BARRETO**<sup>1</sup>, Vinícius Martins **ALECRIM**<sup>1</sup>, Tibério Batista de **MEDEIROS**<sup>2</sup>, Ana Lúcia Coutinho **DOMINGUES**<sup>2</sup>, Edmundo Pessoa **LOPES**<sup>2</sup>, João Roberto Maciel **MARTINS**<sup>3</sup>, Helena Bonciani **NADER**<sup>3</sup>, George Tadeu Nunes **DINIZ**<sup>1</sup>, Sílvia Maria Lucena **MONTENEGRO**<sup>1</sup> and Clarice Neuenschwander Lins de **MORAIS**<sup>1</sup>

Received 22/6/2016  
Accepted 27/9/2016

**ABSTRACT** – **Background** – Periportal fibrosis is the major pathological consequence of the *Schistosoma mansoni* infection. **Objective** – To evaluate the accuracy of serum markers and to construct an index to assess fibrosis. **Methods** – Patients (n=116) with schistosomiasis were evaluated by ultrasound scan and measurements of serum levels of aminotransferases,  $\gamma$ -glutamyl transferase, alkaline phosphatase, hyaluronic acid, cytokines and platelets. Ultrasound images were used to evaluate the fibrosis using Níamey's classification and identified 19 patients without periportal fibrosis (patterns A and B), 48 with mild to moderate fibrosis (C and D) and 49 with advanced fibrosis (E and F). **Results** – Using multivariate analysis, a model was created, which involved alkaline phosphatase and platelets and could separate patients with different patterns of fibrosis. This index showed a better performance in separating patients without fibrosis from with advanced periportal fibrosis. The biological index showed an area under the ROC curve of 1.000. Using values below the lowest or above the highest cut-off point, the presence or absence of advanced fibrosis could be predicted in all patients. **Conclusion** – The index constructed can be used to separate patients with different patterns of periportal fibrosis, specially to predict advanced fibrosis in schistosomiasis patients.

**HEADINGS** – *Schistosomiasis mansoni*. Fibrosis. ROC curve analysis.

## APÊNDICE C - Artigo publicado

Immunobiology 221 (2016) 1351–1354



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/imbio](http://www.elsevier.com/locate/imbio)

Short communication

## Evaluation of serum levels of IL-9 and IL-17 in human *Schistosoma mansoni* infection and their relationship with periportal fibrosis



Ana Virgínia Matos Sá Barreto<sup>a</sup>, Glaucia Alyne Nunes de Lacerda<sup>a</sup>,  
 Anna Lígia de Castro Figueiredo<sup>a</sup>, George Tadeu Nunes Diniz<sup>a</sup>,  
 Elaine Christine Souza Gomes<sup>a</sup>, Ana Lúcia Coutinho Domingues<sup>b</sup>,  
 Constança Simões Barbosa<sup>a</sup>, Sílvia Maria Lucena Montengro<sup>a</sup>,  
 Clarice Neuenschwander Lins de Moraes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE, Brazil<sup>b</sup> Department of Clinical Medicine, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 May 2016

Received in revised form 25 July 2016

Accepted 31 July 2016

Available online 1 August 2016

## Keywords:

Schistosomiasis mansoni

Interleukin-17

Interleukin-9

Evaluation

## ABSTRACT

Serum levels of IL-9 and IL-17 cytokines were evaluated in patients in the acute, chronic phases and clinical forms of human schistosomiasis and in different classifications of periportal fibrosis. No significant differences between the groups of the disease with serum levels of cytokine were found. However, this study discusses the results of some cytokines that have not fully defined roles in the pathology of human schistosomiasis. Furthermore, an examination was made of subjects in the acute phase. This is an important group that is difficult to identify in areas where the disease is endemic. More studies are being undertaken to study the role of IL-9 and IL-17 in human *Schistosoma mansoni* infection and their relationship with the immunopathogenesis of disease.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Schistosomiasis mansoni* is considered to be a disease that is neglected, yet it accounts for an average of 500 deaths annually in Brazil (Brasil, 2014). Schistosomiasis is historically endemic in the rural northeastern region and occurs in chronic forms (Barreto et al., 2015); however, due to the constant migration of infected individuals from endemic areas to other areas, cases of acute infection

which is a pathognomonic sign of *schistosomiasis mansoni* (Prata et al., 2010).

Cytokines produced by immune cells and in particular by CD4<sup>+</sup> lymphocytes may correlate with the evolution of the disease and progression to severe forms. Studies in experimental models (mice) and in infected humans have characterized schistosomiasis as a predominant disease of the Th2 type, involving the production of this cytokine profile as the cause of morbidity and being harmful

## APÊNDICE D - Artigo publicado

ARTIGO  
ORIGINAL**Análise da positividade da esquistossomose *mansoni* em Regionais de Saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010\***

doi: 10.5123/S1679-49742015000100010

**Analysis of Schistosomiasis *mansoni* positivity in endemic Health Regions in the State of Pernambuco, Brazil, 2005-2010****Ana Virgínia Matos Sá Barreto**Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-PE, Brasil  
Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde, Recife-PE, Brasil**Nobélia Duarte Melo**

Universidade de Pernambuco, Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças, Recife-PE, Brasil

**Jéssica Valença Torres Ventura**

Universidade de Pernambuco, Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças, Recife-PE, Brasil

**Rosimery Tavares Santiago**

Universidade de Pernambuco, Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças, Recife-PE, Brasil

**Maria Beatriz Araújo Silva**Universidade de Pernambuco, Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças, Recife-PE, Brasil  
Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, Laboratório Central de Saúde Pública, Recife-PE, Brasil**Resumo**

**Objetivo:** analisar a tendência da positividade da esquistossomose em exames coproscópicos na população de área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil, de 2005 a 2010. **Métodos:** estudo ecológico de série temporal, com dados secundários do Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose, analisados por Regional de Saúde; foram avaliadas as tendências por regressão linear, considerando-se  $p < 0,05$  significativo. **Resultados:** Pernambuco apresentou média de 9,2% de positividade; a Regional de Saúde III (Palmares) apresentou maior média de positividade (13,8%), seguida das regionais II (Limoeiro: 9,9%) e I (Recife: 7,8%); a Regional V (Garanhuns) apresentou melhor média de tratamento (95,6%), seguida da III (86,6%); Pernambuco apresentou tendência decrescente na positividade para esquistossomose ( $p=0,005$ ). **Conclusão:** em geral, há uma tendência decrescente da positividade de esquistossomose em Pernambuco, apesar da queda no número de exames; é importante manter e intensificar as intervenções de controle, com prioridades estratégicas focalizadas em localidades com elevadas prevalências.

**Palavras-chave:** Esquistossomose; Pernambuco; Estudos Ecológicos.

**APÊNDICE E – TCLE do estudo de validação****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE**

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que aceito participar do estudo científico: “VALIDAÇÃO DE ÍNDICE BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA: apoio na triagem dos casos crônicos em áreas endêmicas”. Foi-me explicado que faz parte de minha participação neste estudo um exame médico, exames de sangue e ultrassonográficos antes do tratamento específico para a esquistossomose mansônica, também conhecida como barriga d’água. Os riscos de retirar sangue são dor e hematoma no local, e muito raramente, pode ocorrer desmaio. A quantidade de sangue a ser retirada será cerca de 2 colheres de chá (10ml). Essa retirada de sangue não deve causar problemas para a minha saúde. Minha participação neste estudo não vai me beneficiar diretamente, mas poderá ajudar a entender melhor essa doença. Essa participação é voluntária e eu poderei deixar este estudo a qualquer momento se assim desejar. Os materiais biológicos obtidos nesse projeto serão arquivados em um banco de amostras, podendo ser utilizados em estudos relacionados à imunologia e bioquímica. Caso não queira participar, minha decisão não vai mudar meu atendimento médico ou tratamento nesta unidade de saúde agora ou no futuro. Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Esse termo de consentimento será feito em duas vias para que uma delas permaneça comigo. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com qualquer um das pessoas da equipe médica a qualquer momento pessoalmente ou pelos telefones abaixo:

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes. Fone: 2101-2561

Dra. Sílvia Montenegro. Fone: 2101-2565

Dra. Ana Lúcia Coutinho. Fone: 3227-0927/ 9272-0218

*Recife, de de 201\_*

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável  
Ana Virgínia Matos Sá Barreto  
Doutoranda do Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do CPqAM/FIOCRUZ  
Telefone para contato: 2101-2561

**APÊNDICE F – TCLE do estudo de biomarcadores moleculares****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE**

O senhor está sendo convidado (a) a participar da pesquisa: “**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA MORBIDADE, DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE CRITÉRIO DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**”, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra Clarice N. Lins de Moraes, a qual pretende entender a participação de alguns fatores solúveis e células de defesa do organismo e sua relação com a gravidade da esquistossomose. Sua participação é voluntária e se dará por meio de exame médico, de sangue e ultrassonografia do abdômen superior para a esquistossomose, também conhecida como barriga d’água. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são os riscos de retirar sangue como dor e uma mancha roxa local, que pode ser usado uma compressa de gelo. Também poderá ocorrer constrangimento, mas garantimos o sigilo e sua identidade não será divulgada. Sua participação neste estudo compreenderá exames clínicos, de ultrassonografia e laboratoriais (de fezes e sangue) em 30 dias, 3 e 6 meses após o tratamento para a esquistossomose, e o preenchido de um questionário de coleta dos dados para melhor compreensão da doença. A quantidade de sangue a ser retirada será cerca de 1 colher de sopa (10ml) em tubo de tampa roxa e ½ colher de sopa (5ml) em tubo de tampa vermelha, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Essa retirada de sangue não deve causar problemas para a sua saúde. Esse material será enviado para o laboratório do CPqAM/FIOCRUZ para a realização dos referidos testes e pedimos a sua autorização para armazenar uma pequena quantidade da sua amostra durante o período de desenvolvimento da pesquisa, caso haja necessidade de repetição dos exames e a utilização em pesquisas posteriores. A sua participação neste estudo não vai lhe beneficiar diretamente, mas você receberá o resultado do exame de ultrassonografia e os resultados desta pesquisa poderão colaborar para um melhor acompanhamento no tratamento dos pacientes, além de contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novos tratamentos para os pacientes portadores da doença.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O

(a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Mas está garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Em caso de dúvida ou para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço (Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n - Cx. Postal 7472 - CEP: 50670-420, Recife-PE), ou pelo telefone (81) (2101-2561).

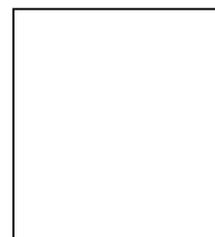
#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Desejo ser informado se a amostra precisar ser analisada futuramente: ( ) SIM ( ) NÃO

Recife, de \_\_\_\_\_ de 201\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante



Impressão datiloscópica

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a) Responsável  
Clarice N. Lins de Moraes Fonseca

Tecnologista em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ  
Telefone para contato: (81) 2101-2561/ (81) 98622-2210

**APÊNDICE G – Ficha do paciente****FICHA DE PACIENTES DE CAMPO**

Nº: \_\_\_\_\_

1) Nome do paciente: \_\_\_\_\_

2) Data de nascimento: \_\_\_\_\_ 3) Sexo: \_\_\_\_\_

4) Município de residência: \_\_\_\_\_

5) Endereço: \_\_\_\_\_

6) Telefone para contato: \_\_\_\_\_

7) Histórico Epidemiológico:

Banho em rio, açude, lago, lagoa: sim ( ) não ( )

Quando? \_\_\_\_\_

Onde? \_\_\_\_\_

Cidade de origem: \_\_\_\_\_

Já teve esquistossomose antes? sim ( ) não ( )

Já tomou praziquantel alguma vez? sim ( ) não ( )

8) Exame Parasitológico de fezes:

Kato-Katz: positivo ( ) negativo ( )

Data: \_\_\_\_\_

9) Tratamento específico com praziquantel 600mg: sim ( ) não ( )

Data: \_\_\_\_\_

10) Ultrassonografia do Abdômen Superior

Padrão de FPP (Niamey): \_\_\_\_\_

Lobo direito do fígado: \_\_\_\_\_

Lobo esquerdo do fígado: \_\_\_\_\_

Baço longitudinal: \_\_\_\_\_

Veia Porta: \_\_\_\_\_

Veia Esplênica: \_\_\_\_\_

11) Hepatite B: sim ( ) não ( )

12) Hepatite C: sim ( ) não ( )

13) Uso de imunossupressores: sim ( ) não ( )

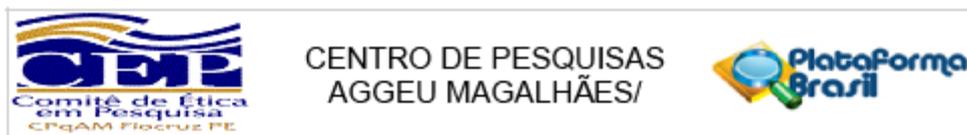
14) Transplante de Fígado: sim ( ) não ( )

15) Ingestão de álcool: sim ( ) não ( )

16) Doença renal crônica: sim ( ) não ( )

17) Data de Retorno: \_\_\_\_\_

## ANEXO A – Parecer CEP/IAM



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** VALIDAÇÃO DE ÍNDICE BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA: apoio na triagem dos casos crônicos em áreas endêmicas

**Pesquisador:** ana virgínia matos sá barreto

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 32488214.0.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.341.698

**Apresentação do Projeto:**

O projeto é apresentado de forma correta, com todos os itens necessários e contendo todas as informações necessárias para compreensão do estudo, inclusive com as Considerações Éticas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Validar o índice biológico – Coutinho-index – para o diagnóstico da fibrose periportal como apoio na triagem dos casos crônicos da esquistossomose mansônica em áreas endêmicas do estado de Pernambuco.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

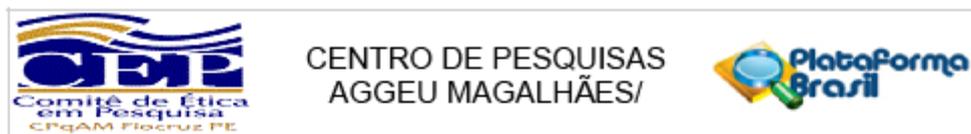
Os benefícios estão bem descritos ao longo do projeto, uma vez que o diagnóstico precoce da Fibrose PeriPortal na esquistossomose mansônica é de grande importância na triagem de pacientes crônicos. Nesse sentido a pesquisa sugere a identificação de marcadores biológicos para detecção da fibrose. Os riscos estão claramente relacionados apenas à coleta sangue venoso, uma vez que o exame adicional é o ultrassom, o qual não origina nenhum risco.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de relevância regional e nacional, tendo como principal objetivo a detecção precoce da

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br

## ANEXO B – Parecer CEP/IAM



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA MORBIDADE, DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE CRITÉRIO DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.

**Pesquisador:** clarice neuenschwander lins de morais fonseca

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50950615.9.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.589.391

## Apresentação do Projeto:

Projeto apresentado com linguagem clara, concisa e bem referenciado.

O projeto na íntegra (brochura) está estruturado no formato exigido pelo edital de financiamento.

## Objetivo da Pesquisa:

Avaliar marcadores imunológicos e moleculares para morbidade, diagnóstico e critério de cura pós terapêuticos em pacientes com esquistossomose mansônica.

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Consta uma descrição sucinta em "Informações Básicas do Projeto" e no TCLE. Como benefícios está declarado que 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

## Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa considerada relevante e apresenta no projeto todas as informações necessárias para sua

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br