



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE

Débora Nascimento da Nóbrega

**Avaliação da expressão do miR-10a e Interferon gama (*IFNG*) antes e após o tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica**

Recife

2022

Débora Nascimento da Nóbrega

**Avaliação da expressão do miR-10a e Interferon gama (*IFNG*) antes e após tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Coorientadores:

Profa. Dra. Elaine Christine Souza Gomes

Profa. Dra. Taciana Furtado De Mendonça Belmont

Recife

2022

Título do trabalho em inglês: MiR-10a and Interferon gamma (IFNG) expression before and after treatment with praziquantel in chronic *Schistosoma mansoni* infection.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

N999a Nóbrega, Débora Nascimento da.  
Avaliação da expressão do miR-10a e Interferon gama (IFNG) antes e após tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica / Débora Nascimento da Nóbrega. -- 2022.  
100 p. : il.color.

Orientador: Luydson Richardson Silva Vasconcelos.  
Coorientadores: Elaine Christine Souza Gomes e Taciana Furtado de Mendonça Belmont.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.  
Bibliografia: f. 54-59.

1. esquistossomose. 2. Interferon gama. 3. MicroRNAs. 4. praziquantel. 5. regulação da expressão gênica. I. Título.

CDU 616.995.122

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239  
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Débora Nascimento Da Nóbrega

**Avaliação da expressão do miR-10a e Interferon gama (*IFNG*) antes e após tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Data da aprovação: 11 de outubro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**



Assinado de forma digital por  
Luydson Richardson Silva  
Vasconcelos:01063888433  
Dados: 2023.03.14 10:55:35 -03'00'

---

Drº Luydson Richardson Silva Vasconcelos  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Assinado de forma digital por  
Fabio Lopes de Melo:53940822434  
Dados: 2023.03.14 10:48:35 -03'00'

---

Drº Fábio Lopes de Melo  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Walter Lins Barbosa  
Junior:01544274467

Assinado de forma digital por Walter Lins  
Barbosa Junior:01544274467  
DN: cn=Walter Lins Barbosa  
Junior:01544274467, ou=FIOCRUZ - Fundacao  
Oswaldo Cruz, o=ICPEdu, c=BR  
Dados: 2023.03.14 15:12:44 -03'00'

---

Drº Walter Lins Barbosa Junior  
Centro Universitário da Vitória de Santo Antão

Dedico este trabalho a todos os moradores de Ipojuca (PE) que se dispusera a contribuir na pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luydson Vasconcelos pela confiança no meu trabalho nos momentos de tensão, pelas oportunidades ofertadas e pela compreensão desenvolvida na convivência.

Às minhas coorientadoras Dra Elaine Gomes e Dra Taciana Furtado pelos ensinamentos, conselhos, pelo carinho e atenção.

Aos profissionais e técnicos do Laboratório de Referência em Esquistossomose, Sr. Fernando, Fatinha, Valdeci, Barnabé e Íris, pois sem eles não seria possível ter alcance na população do estudo, além de todo incentivo que me forneceram.

Aos doutores Wheverton e Walter pelas instruções e dicas acadêmicas.

À Dra Ana Lúcia por realizar a avaliação clínica dos pacientes com tanta dedicação.

À Dra Clarice Neuenschwander e Dra Ana Virgínia pela colaboração no estudo.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas, em especial Keylla Santiago, Rodrigo Loyo, Alejandra Navarro, Rhaíssa Ramos e Professor Fábio Lopes pelas companhias e apoio.

Aos meus colegas de turma pelas colaborações nas disciplinas.

Aos doutores Raul Lima e Gustavo Lima pelas orientações técnicas.

Aos funcionários do Instituto Aggeu Magalhães que são responsáveis por manter toda estrutura do Instituto funcionando, na recepção, segurança, limpeza, esterilização, distribuição de materiais e muitos outros serviços.

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

Aos amigos que se tornaram com o tempo meus irmãos, Kleyton Palmeira, Roberta Santos e Bruna Monteiro, sem o incentivo dessas pessoas a rotina e as lutas diárias seriam mais difíceis de suportar.

Ao Sr. Edson por acompanhar toda minha trajetória desde o primeiro dia de aula na faculdade, há 7 anos atrás, e por toda ajuda técnica de informática.

À minha tia Netinha por abrir as portas de sua casa nos dias de longos experimentos.

À minha vizinha pelo carinho, pelos conselhos dados e pelo amor de sempre.

À minha família por todas as lutas passadas, essas são as pessoas que eu não escolhi conviver, mas que foi me dada desde o dia do meu nascimento, e provavelmente serão as únicas no final da minha vida. Se eu não aprender a amar

essas pessoas todas as outras mencionadas acima também não teriam valor algum, porque a família é o projeto principal do dono da sabedoria.

Ao meu pai celestial por segurar minha mão todas as vezes que precisei passar pela escuridão.

“Onde não existe conselho fracassam os bons planos, mas com a cooperação de  
muitos conselheiros há grande êxito.”  
Provérbios de Salomão



## RESUMO

NÓBREGA, Débora Nascimento. Avaliação da expressão do miR-10a e Interferon gama (*IFNG*) antes e após tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife 2022.

A esquistossomose está entre as doenças parasitárias que mais preocupam em termos de saúde pública, pois embora tenha sido preconizado o uso do Praziquantel como tratamento dos doentes há mais de 40 anos, muitas comunidades endêmicas não conseguem eliminar a doença apesar dos esforços de tratamento em massa. O INF- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória que é liberada por linfócitos T helpers 1 (Th1) no início da infecção para combater o parasita. Alguns estudos realizados no Brasil mostraram evidências de que ele também pode ser liberado após o tratamento em alguns indivíduos e isto poderia conferir resistência à reinfecções em áreas endêmicas. No entanto, reguladores pós-transcricionais como os microRNAs (miR) podem ser responsáveis pela variação individual na susceptibilidade de infecções e na cronicidade da doença. O miR-10a é antagonista do IFN- $\gamma$ , inibe a resposta Th1 sendo produzidos por células T reguladoras, e aumenta a expressão de TGF $\beta$ 1, contribuindo com um estado crônico. O objetivo deste trabalho constitui-se em avaliar a expressão de miR-10a e *IFNG* como biomarcadores de inflamação e investigar a correlação entre eles e o tratamento com Praziquantel. Para isso, foram avaliadas 45 amostras armazenadas no biorrepositório, 30 pertencentes ao grupo de indivíduos com diagnóstico positivo para *S. mansoni* e 15 pertencentes ao grupo de indivíduos sem infecção ativa (controles). Para a predição de genes-alvo para miR-10a no TargetScan v.8.0, o enriquecimento foi realizado utilizando o banco de dados on-line DAVID para Anotação Funcional de Processos Biológicos, Função Molecular e Vias Metabólicas. O ensaio de expressão de miR-10a e *IFNG* utilizou a abordagem do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O enriquecimento mostrou 3459 genes-alvo que atuam na Regulação das Vias de Sinalização, Regulação da Transcrição, Regulação da Tradução e Silenciamento de genes mediados por RNA. No entanto, os níveis de expressão do miR-10a não mostraram diferenças estatísticas antes e após o tratamento. Em contraste, o *IFNG* foi significativamente maior em indivíduos antes do tratamento com Praziquantel do que após 90 dias. As conclusões mostraram que apesar de atuar na regulação de genes-alvo com atividade reguladora, o miR-10a não apresentou evidências como biomarcador de inflamação no acompanhamento terapêutico na esquistossomose, e os níveis de expressão de *IFNG* foram significativamente maiores antes do tratamento.

Palavras chaves: esquistossomose; Interferon gama; microRNA; praziquantel; regulação da expressão gênica.

## ABSTRACT

NÓBREGA, Débora Nascimento. MiR-10a and Interferon gamma (*IFNG*) expression before and after treatment with praziquantel in chronic *Schistosoma mansoni* infection. 2022. Dissertation (Master's degree biosciences and biotechnology in health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Schistosomiasis are among the parasitic diseases that are most of concern in terms of public health, because although praziquantel has been recommended to be used as a treatment for patients for more than 40 years, many endemic communities cannot eliminate the disease despite mass treatment efforts. INF- $\gamma$  is a pro-inflammatory cytokine that is released by T helpers 1 (Th1) lymphocytes at the beginning of infection to fight the parasite. Some studies conducted in Brazil have shown evidence that it can also be released after treatment in some individuals and this could confer resistance to reinfections in endemic areas. However, post-transcriptional regulators such as microRNAs (miR) may be responsible for individual variation in infection susceptibility and chronicity of the disease. miR-10a is an INF- $\gamma$  antagonist, inhibits th1 response being produced by regulatory T cells, and increases TGF $\beta$ 1 expression, contributing to a chronic state. The Objective this study was to evaluate the expression of miR-10a and *IFNG* as biomarkers of inflammation and to investigate the correlation between them and Praziquantel treatment. For this, 45 samples stored in the biorepository were evaluated, 30 belonged to the group of individuals with a positive diagnosis for *S. mansoni* and 15 belonged to the group of individuals without infection (controls). For the prediction of target genes for miR-10a in TargetScan v.8.0, enrichment was performed using the DAVID online database for Functional Annotation of Biological Processes, Molecular Function and Metabolic Pathways. Expression assay of miR-10a and *IFNG* used the approach the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The enrichment showed 3459 target genes that act in the Signaling Pathways Regulating, Transcription Regulation, Translation Regulation and RNA-mediated gene silencing. However, miR-10a expression levels did not show statistical differences before and after treatment. In contrast, *IFNG* was significantly higher in individuals before Praziquantel treatment than after 90 days. Conclusion: The conclusions showed that despite acting in the regulation of target genes with regulatory activity, miR-10a did not present evidence as a biomarker of inflammation in the therapeutic follow-up in schistosomiasis, and the levels of *IFNG* expression were significantly higher before treatment

**Keywords:** schistosomiasis; interferon-gamma; microRNA; praziquantel; gene expression regulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição Global da Esquistossomose.....	20
Figura 2 –	Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil.....	22
Figura 3 –	Distribuição geográfica dos municípios prioritários para esquistossomose. Pernambuco, 2015.....	24
Gráfico 1 –	Número de exames realizados e percentual de positividade para esquistossomose. Pernambuco, 2004-2014 Ciclo de vida do parasita.....	24
Figura 4 –	Ciclo de vida do parasita.....	27
Figura 5 –	Subtipos de células T helper's e função na imunotogênese.....	31
Figura 6 –	Classificação de Niamey para fibrose em esquistossomose.....	35
Figura 7 –	Formula para calcular o valor de APRI.....	37
Figura 8 –	Fórmula para calcular o valor de FIB-4.....	37
Gráfico 2 –	Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ) da expressão de <i>IFNG</i> e miR-10a....	46
Gráfico 3 –	Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ) da expressão de <i>IFNG</i> e miR-10a antes e após o tratamento com referência da expressão de amostras controles.....	46
Quadro 1 –	Testes de correlação entre <i>IFNG</i> e miR-10a.....	47
Quadro 2 –	Correlação entre Marcadores Bioquímicos de inflamação hepática com a expressão de <i>IFNG</i> e miR-10a.....	47
Gráfico 4 –	Anotação de vias (KEGG) a partir do enriquecimento de genes alvos de miR-10a.....	49
Gráfico 5 –	Anotação Funcional (UNIPROT) a partir do enriquecimento de genes alvo de miR-10a.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALP</b>	Fosfatase Alcalina
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato AminoTransferase
<b>AUC</b>	Area Under Curve
<b>BD</b>	Bilirrubina Direta
<b>BI</b>	Bilirrubina Indireta
<b>CP</b>	Carga Parasitária
<b>DALY'S</b>	Disability-adjusted life years
<b>DHGN</b>	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
<b>EHE</b>	Esquistossomose Hepatosplênica
<b>EHI</b>	Esquistossomose Hepatointestinal
<b>EXOMIR</b>	MicroRNA exossomal
<b>GGT</b>	Gama Glutamil Transferase
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HSC</b>	Célula Estrelada Hepática
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPG</b>	Ovos por grama de fezes
<b>PCE</b>	Programa de Controle da Esquistossomose
<b>PECE</b>	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
<b>PZQ</b>	Praziquantel
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
<b>US</b>	Ultrassonografia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	GERAL.....	16
2.2	ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL.....</b>	<b>18</b>
4.1	ESQUISTOSSOMOSE NO MUNDO.....	18
4.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL.....	21
4.3	CICLO EVOLUTIVO E ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE.....	25
4.4	TRATAMENTO.....	28
4.5	IMUNOPATOGÊNESE NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA .....	29
4.6	DIAGNÓSTICOS.....	32
<b>4.6.1</b>	<b>Métodos diretos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Métodos indiretos.....</b>	<b>33</b>
4.7	PROGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA MORBIDADE.....	33
<b>4.7.1</b>	<b>Endoscopia, Ressonância Magnética e Ultrassonografia.....</b>	<b>35</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Marcadores séricos de dano hepático.....</b>	<b>35</b>
4.7.2.1	Fosfatase Alcalina (ALP), Bilirrubina e Gama Glutamiltransferase (GGT).....	36
4.7.2.2	FIB-4 e APRI.....	36
4.7.2.3	Ferritina.....	37
4.8	MICRORNAS.....	37
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
5.1	DESENHO DE ESTUDO.....	41
5.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	41
5.3	CARGA PARASITÁRIA.....	41
5.4	GRUPOS DE ESTUDO.....	42
5.5	DOSAGEM DE MARCADORES DE DANO HEPÁTICO.....	43
5.6	EXTRAÇÕES DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E ENSAIO DE	

	EXPRESSÃO.....	43
5.7	PREDIÇÃO DE GENES E ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL.....	43
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
6.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	45
6.2	EXPRESSÃO DE <i>IFNG</i> E miR-10a.....	46
6.3	CORRELAÇÃO ENTRE miR-10a, <i>IFNG</i> , CARGA PARASITÁRIA, FIBROSE E TRATAMENTO.....	47
6.4	PREDIÇÃO DE GENES ALVOS DO MIR-10A, ENRIQUECIMENTO DE VIAS MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E FUNÇÃO MOLECULAR DOS GENES.....	49
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PPESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES.....</b>	<b>60</b>
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO MAIOR DE IDADE.....</b>	<b>63</b>
	<b>APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO MENOR DE IDADE.....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE E – ARTIGO ACEITO.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1948 a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a relevância da esquistossomose para a Saúde Pública, e em 1980 os laboratórios Bayer e Merck desenvolveram o praziquantel, posteriormente a OMS recomendou o tratamento em larga escala com praziquantel em populações com risco de infecção, juntamente com outras medidas complementares de prevenção (OMS, 2013).

No entanto, esse plano de tratamento não é eficaz em muitas áreas endêmicas com dificuldade no fornecimento de água potável, saneamento e educação. A esquistossomose logo passou a assumir novos cenários de transmissão em locais urbanos, elevando custos indiretos como auxílio-doença e morte prematura (OMS, 2013).

Dados do Ministério da Saúde apontam a região Nordeste (NE) do Brasil como a responsável pelo maior registro de casos de esquistossomose, e situam Pernambuco (PE) entre os estados com prevalência média mais elevada de pessoas infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) (BRASIL, 2011). Conseqüentemente, a maioria das mortes notificadas por esquistossomose no Brasil foi notificada na região Nordeste, desde 1980 a 2017, e PE apresenta 50,7 % do percentual de mortes na região (PAZ et al., 2020).

Estudos epigenéticos experimentais in vivo e in vitro, relacionados à regulação pós-transcricional por microRNAs (miR) na esquistossomose mansônica revelam marcadores potenciais ao prognóstico, e contribui ao conhecimento das vias gênicas e proteínas associadas pontualmente ao quadro clínico, favorecendo a identificação de alvos terapêuticos na doença hepática associada à esquistossomose (CHEN et al., 2019).

Nas fases iniciais da esquistossomose um nível acentuado de IFN- $\gamma$  é liberado por células Th1 que lideram uma resposta inflamatória contra o verme (infecção (HIATT et al., 1979). Essa resposta é posteriormente controlada por célula T reguladoras (reg) da linhagem Foxp3, que expressam miR-10a para inibir a resposta Th1 inflamatória, e conseqüentemente, inibe a expressão de IFN- $\gamma$  (KELADA et al., 2013).

A família do miR-10a é conhecida por regular genes Hox, participantes na proliferação celular, com isso este miRNA foi associado com multiformes tipos de cânceres, e na resistência às drogas usadas no tratamento oncológico (PEARSON *et al.*, 2005). Na esquistossomose, um estudo realizado por Cabantous *et al.* (2019) revelou que o miR-10a foi significativamente *upregulated* em indivíduos com fibrose hepática provocada por *Schistosoma mansoni*. Essa associação do miR-10a com fibrose está relacionada ao seu envolvimento na via TGF-  $\beta$ , tendo como alvo o gene *tgfb*, aumentando sua expressão (ZHOU *et al.*, 2016).

Por outro lado, o IFN- $\gamma$  é um antagonista de TGF-  $\beta$  e um aumento da expressão de IFN-  $\gamma$  foi encontrado em PBMCs de indivíduos resistentes à infecção por *S. mansoni* quando estimulados com antígenos solúveis do ovo, quando comparado com PBMCs de indivíduos previamente infectados e estimuladas da mesma forma (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Sugerindo dessa forma, que o IFN- $\gamma$  pode ser responsável por provocar resistência à infecção.

Por isso, a proposta deste estudo foi avaliar a expressão do miR-10a e IFN- $\gamma$  no tratamento da esquistossomose e investigar uma correlação com fibrose hepática e carga parasitária de indivíduos durante infecção por *S. mansoni*.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a expressão do miR-10a e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) antes e após tratamento com praziquantel para *Schistosoma mansoni* na infecção crônica.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Investigar as principais vias reguladas pelo miR-10a e processos biológicos envolvidos.

Avaliar a expressão de miR-10a e IFN- $\gamma$  e investigar a correlação com o tratamento para *Schistosoma mansoni*.

Investigar a correlação de IFN- $\gamma$  e miR-10a com fibrose hepática e carga parasitária.

### 3. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença negligenciada de grande impacto social, e está entre as parasitoses mais preocupantes no mundo devido à sua mortalidade e morbidade. Desse modo, em decorrência da alta prevalência, o Programa Sanar, foi instituído pelo Decreto nº 39.497, de 11 de junho de 2013, com o intuito de reduzir ou eliminar doenças transmissíveis e negligenciadas, tais como a esquistossomose, enquanto problema de saúde pública.

Mesmo havendo medidas de controle e tratamento eficazes sugeridas pelo Programa Sanar, a esquistossomose não foi eliminada e permanece endêmica no Estado de Pernambuco, assim como em outras regiões do país, com novos cenários de transmissão e prevalência da doença.

O prognóstico para fibrose hepática decorrente da infecção é realizado tardiamente e não há medidas eficazes no tratamento de pacientes crônicos na recuperação do tecido hepatoesplênico e demais órgãos. Estudos epigenéticos, relacionados à regulação pós-transcricional por microRNAs na esquistossomose mansônica **em humanos** são escassos no entanto, estudos em áreas endêmicas para outras espécies de *Schistosoma* demonstraram que estes podem ter um papel fundamental na regulação dos graus de fibrose hepática, antes e após o tratamento com praziquantel (CABANTOUS *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; CAI *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2020).

Desta forma, a utilização de biomarcadores pode determinar a predisposição do indivíduo ao desenvolvimento das formas hepáticas crônicas, propondo um diagnóstico diferencial, além de contribuir com o conhecimento para produção de novos alvos terapêuticos, a fim de reduzir o número de pacientes direcionados à esplenectomia, ao transplante de fígado, mortalidade precoce, e, assim, minimizar os impactos gerados pelos comprometimentos oriundos da esquistossomose, favorecendo, também, a redução dos gastos de recursos públicos dirigidos para este fim.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 4.1 ESQUISTOSSOMOSE NO MUNDO

A esquistossomose é uma doença presente na humanidade desde a antiguidade, relatada em papiros egípcios. Ovos de *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*) calcificados foram encontrados em múmias egípcias por volta de 1.200 a.C (RUFFER,1910), e também ovos de *S. japonicum* foram encontrados em dois cadáveres antigos (há mais de 2100 anos) nas províncias de Hunan e Hubei, na China (WEI *et al.* 1980). Entretanto, o parasita (*S. haematobium*) só foi descoberto em 1851 pelo médico Theodor Bilharz, razão pela qual a doença também é chamada de bilharzia, em referência ao sobrenome dele (LOVERDE, 2019).

A doença atinge 78 países de regiões tropicais e subtropicais, responsável globalmente por 11.792 mortes por ano, sendo este valor subestimado. (OMS, 2023)(OMS, 2010). Segundo dados publicados em 2010 pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), foram estimados que o número de pessoas infectadas por *Schistosoma spp.* no mundo alcançava 240 milhões e apenas 17,5 milhões de pessoas foram tratadas, e 33% dessas pessoas, foram tratadas principalmente na China, Egito e Iêmen (OMS, 2010). Em 2023 a OMS publicou que em 2021 as estimativas mostraram que pelo menos 251,4 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo para esquistossomose, e destas pessoas foram tratadas apenas cerca de 75,3 milhões (OMS, 2023). Mundialmente, das 779 milhões de pessoas que vivem sob risco de infecção, 85% delas estão na África (CHITSULO *et al.*, 2000, ENGLÉS *et al.*, 2002). E mais de 90% dos indivíduos infectados vivem na África por mais de duas décadas (OMS, 2023; CHITSULO *et al.*, 2000; ENGLÉS *et al.*, 2002).

O Egito apresentou o período mais longo de tratamento em massa com Praziquantel (PZQ) no continente africano, tendo um grande progresso contra *S. mansoni* no Delta do Nilo, e contra *S. haematobium* do Nilo ao sul de Cairo (1993-2006). Um estudo foi conduzido no Egito, na parte do norte do Delta do Nilo, em duas aldeias, uma de alta prevalência (El-Rouse, n= 993) e outra de baixa prevalência (Ebiana, n= 614) no período de 1994 a 1996. A prevalência de *S. mansoni* foi de 35,8% em Ebiana e 69,5% em El-Rouse, com intensidade de

infecção quase o triplo de Ebiana no começo do estudo. Após o tratamento com PZQ, a prevalência e a intensidade de infecção diminuíram significativamente nas duas aldeias no terceiro ano do estudo, caindo para 15,3% e 48,8% (Ebiana e El-Rose, respectivamente), mas a taxa de reinfecção no último ano do estudo foi de 32,9% em Ebiana e 70,6% em El-Rouse (ELMORSHEDY, et al., 2020).

Na China, por volta de 1930, a situação epidemiológica da esquistossomose alcançou 11,6 milhões de pessoas infectadas com *S. japonicum*, 1,2 milhões de bovinos infectados, 14,3 bilhões de metros quadrados com caramujos *Oncomelania hupensis*, mais de 100 milhões de pessoas em risco. Foi realizado um censo pelo governo central na época, onde 12 províncias no sul da China foram comprovadamente endêmicas. O plano de controle da esquistossomose se iniciou em 1950 com o controle do hospedeiro intermediário com moluscicida, instalações sanitárias, conservação de águas em terras agrícolas e educação sanitária; em 1980 foi iniciado o tratamento em massa da população e dos animais com PZQ. No entanto, a terceira fase do controle da esquistossomose, no início dos anos 2000, foi caracterizada pelo controle integrado e manejo das fontes de infecção (proibição de pastagens, melhoria de água potável e saneamento) (SONG *et al.*, 2016).

Jiangsu é uma das 12 províncias mais afetadas pela esquistossomose, tendo acumulado 253,07 milhões de pacientes e uma área de 1,47 bilhões de metros quadrados habitados pelo caramujo durante todos esses anos. Após 60 anos de prevenção e controle, a prevalência caiu para menos de 1% (WANG *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2011).

Embora o tratamento em massa tenha avançado e diminuído a transmissão da esquistossomose nesses países mencionados acima, ainda são necessárias medidas profiláticas para o controle de reinfecções, melhorias na atenção básica e no desenvolvimento de tratamentos efetivos na doença crônica, como no Brasil com alta transmissão por *S. mansoni*, também em outros países com alta transmissão por *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, que precisam de uma intensificação maior no controle da esquistossomose, como exemplo, Filipinas, Sudão, e Somália, apresentado na figura 1 (OMS, 2010).

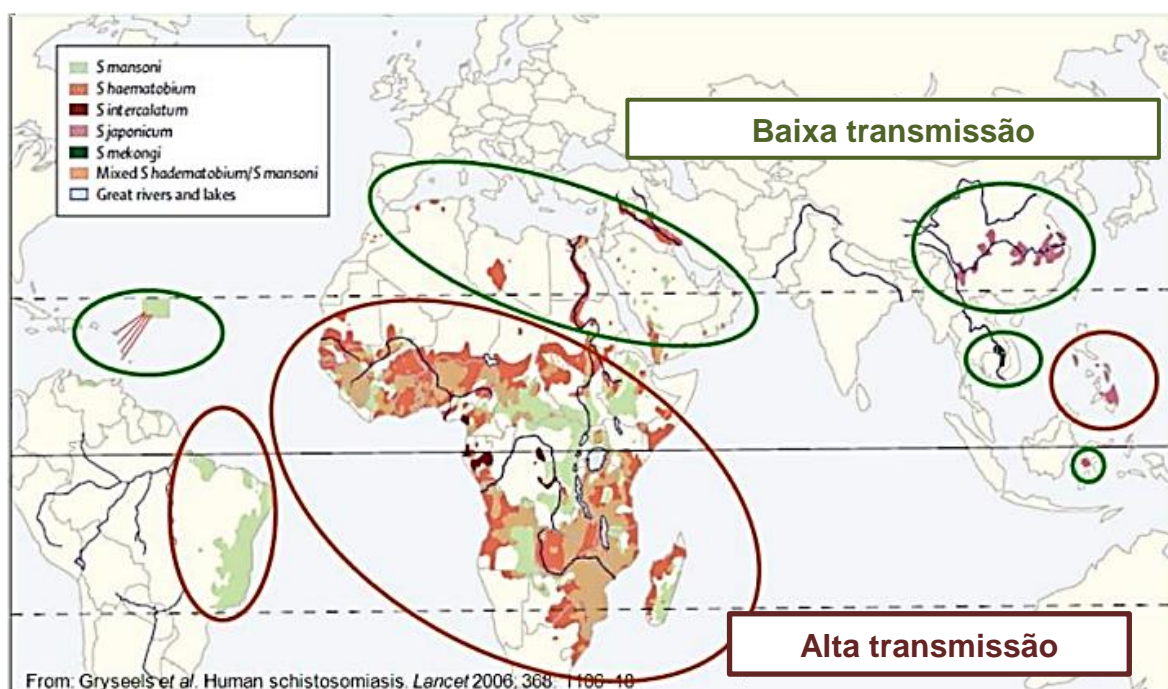
Estudos realizados nas Filipinas, nos distritos do Norte de Samar (Catarman, Laong e Palag), demonstram que a maior parte da população afetada por *S. japonicum* é constituída por agricultores de arroz com baixo nível escolar (48,6%).

Muitas moradias são formadas por paredes (35,5%) e telhados (56,8%) de nipa ou palma, e piso de cimento (53,6%). Além disso, 30% dos residentes não possuem água encanada no banheiro (ROSS *et al.*, 2015). Outros estudos revelam que 50% dessa região vive abaixo da linha de pobreza, com suprimento de água, saneamento e higiene rudimentares (ROSS *et al.*, 2013).

A prevalência para *S. japonicum* foi estimada nas Filipinas em 27,1%, sendo também endêmica para *Ascaris lumbricoides* (40,3%), *Trichuris trichiura* (62,4%), e ancilostomíase (31,3%), e apresenta programas de controle ativo por mais de três décadas, incluindo o programa de Administração em Massa de Medicamentos (MDA - Mass drug Administration) (ROSS *et al.*, 2015).

Segundo dados da OMS (2022), 51 países requerem quimioterapia preventiva. Apesar de todos os esforços, Filipinas e Egito são exemplos dentre outros 32 países que precisam expandir MDA para todas as áreas endêmicas, outros 15 países, incluindo o Brasil, estão entre os que adotaram MDA de forma irregular e dois países (Guiné Equatorial e África do Sul) não iniciaram MDA. Enquanto China e mais 18 países necessitam de avaliação para verificar a interrupção da transmissão.

Figura 1 – Distribuição Global de Esquistossomose



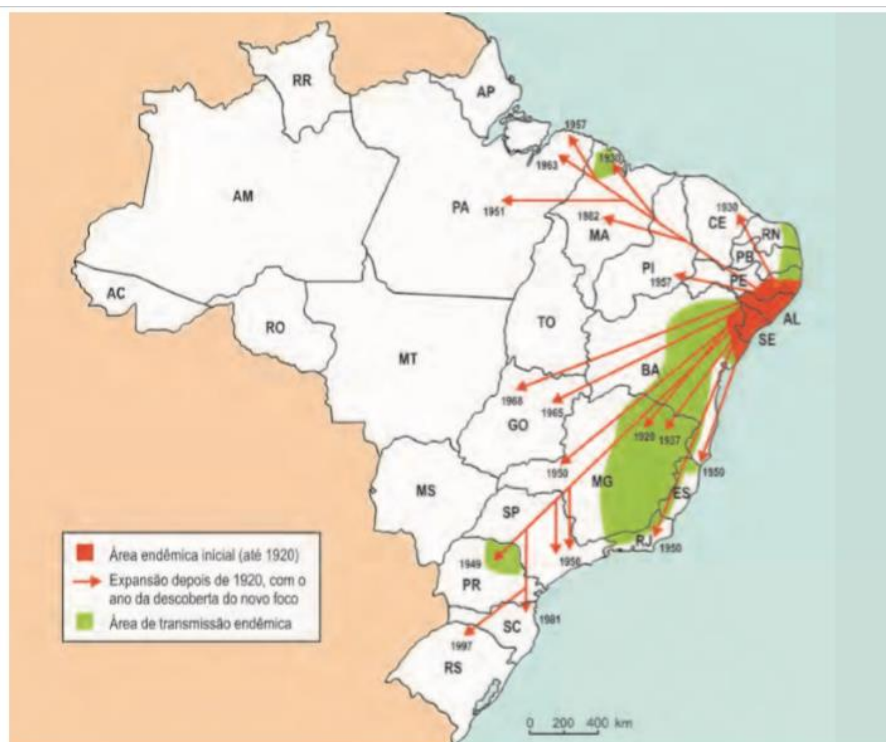
Fonte: GRYSEELS *et al.* Human Schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368: 1106-18 (Adaptado por OMS. Geneva, Switzerland, 26 January 2010).

Na América, a esquistossomose foi introduzida junto com o tráfico de escravos entre os séculos dezesseis e dezenove, mas somente a espécie *Schistosoma mansoni*, proveniente da África, conseguiu se estabelecer infectando caramujos nativos do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. straminea*, *B. kuhniana*, *B. prona*, and *B. tenagophila*) (BRASIL, 2010). Na América, a esquistossomose mansônica é endêmica no Brasil, Suriname, Venezuela, República Dominicana, e nas ilhas Santa Lúcia e Guadeloupe.

#### 4.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL

A história da transmissão de esquistossomose no Brasil acompanha a evolução econômica no país, a partir do tráfico de escravos da costa Ocidental da África para trabalhar nas lavouras-de-açúcar, nos portos de Recife e Salvador, principalmente. Entretanto, a doença se expandiu do litoral para o centro, no Nordeste brasileiro (NOYA, 2015). Com o declínio da cana-de-açúcar, e início do ciclo do ouro, a endemia foi introduzida em Minas Gerais, e permanece em 19 dos 27 Estados brasileiros, alcançando do litoral do Maranhão ao Espírito Santo e Minas Gerais, e também apresenta focos em outros Estados nas cinco regiões, em virtude de fatores que contribuem para seu estabelecimento, como: Saneamento precário, ampla distribuição dos hospedeiros intermediários e suscetibilidade ao *S. mansoni*, grande capacidade de postura das fêmeas, longevidade dos vermes adultos e o caráter crônico da doença (MS, 2014; BARRETO *et al.*, 2015) (figura 2).

Figura 2 – Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil



Fonte: (BRASIL, 1998, com adaptações feitas por Heloisa M. N. Diniz).

Fonte: BRASIL, 1998 (Adaptado por Heloísa M. N. Diniz).

Em 1975, foi implantado o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), com o objetivo de, primeiramente, realizar inquéritos coproscópicos e malacológicos e, em seguida, realizar tratamento em massa da população, controlar o vetor e realizar saneamento em locais específicos. E, por fim, realizar vigilância epidemiológica e controle de novos casos. Esse programa foi alterado, posteriormente, para o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) em 1980 (GOMES *et al.*, 2017).

De 2000 a 2003, o percentual de positividade de humanos infectados era em média 7% e, de 2004 a 2012, o percentual decresceu para 4,5%, entretanto, o percentual de positividade se aproxima da prevalência, mas não reflete com totalidade e precisão a situação real da população, depende do número de pessoas examinadas que representam uma parcela da população (BARRETO, 2015).

Entre 2008 e 2016, a vigilância examinou 12.411.898 pessoas, das quais 9.140.139 foram examinadas; 425.231 eram positivas e 363.857 receberam tratamento e, nesse período, 4.473 pessoas foram a óbito (MS, 2018). A região Nordeste é a que apresenta maiores índices de prevalência, com 74,7% de

positividade nos anos de 2008 a 2016, e Pernambuco é o segundo Estado com maiores índices, perdendo apenas para Alagoas (Tabela 1) (MS, 2018).

Tabela 1 – Número e percentual de casos positivos de esquistossomose mansoni por Unidade da Federação (UF), região e Brasil, 2008 a 2016

Região/Unidade da Federação	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total	%
<b>Norte</b>	467	332	164	448	167	28	25	15	8	1.654	0,4
Pará	467	332	164	448	167	28	25	15	8	1.654	0,4
<b>Nordeste</b>	52.565	56.112	50.837	43.246	28.872	29.750	27.525	17.664	11.102	317.673	74,7
Maranhão	3.904	5.200	5.083	3.381	2.491	2.857	3.139	2.128	920	29.103	6,8
Piauí	2	-	1	-	-	-	-	-	-	3	0,0
Ceará	183	139	121	37	44	53	115	118	-	810	0,2
Rio Grande do Norte	1.405	1.807	2.829	1.073	837	612	727	154	-	9.444	2,2
Paraíba	3.626	4.886	2.053	2.411	2.074	2.020	2.410	-	-	19.480	4,6
Pernambuco	8.850	8.718	8.186	7.623	5.336	6.509	8.748	7.299	3.766	65.035	15,3
Alagoas	16.203	16.321	13.283	13.003	11.384	12.652	9.775	7.965	6.416	107.002	25,2
Sergipe	8.258	8.199	8.844	8.534	1.767	3.308	2.551	-	-	41.461	9,8
Bahia	10.134	10.842	10.437	7.184	4.939	1.739	60	-	-	45.335	10,7
<b>Sudeste</b>	22.234	20.009	18.384	16.242	9.784	7.260	5.807	4.755	899	105.374	24,8
Minas Gerais	19.445	17.098	16.276	14.339	8.323	6.444	4.828	3.998	438	91.189	21,4
Espírito Santo	2.787	2.898	2.103	1.891	1.461	816	979	757	461	14.153	3,3
Rio de Janeiro	2	13	5	12	-	-	-	-	-	32	0,0
<b>Sul</b>	227	266	33	4	-	-	-	-	-	530	0,1
Paraná	225	266	33	4	-	-	-	-	-	528	0,1
Santa Catarina	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,0
<b>Total</b>	75.493	76.719	69.418	59.940	38.823	37.038	33.357	22.434	12.009	425.231	100,0

Fonte: SISPCE/CGHDE/DEVIT/SVS/MS.

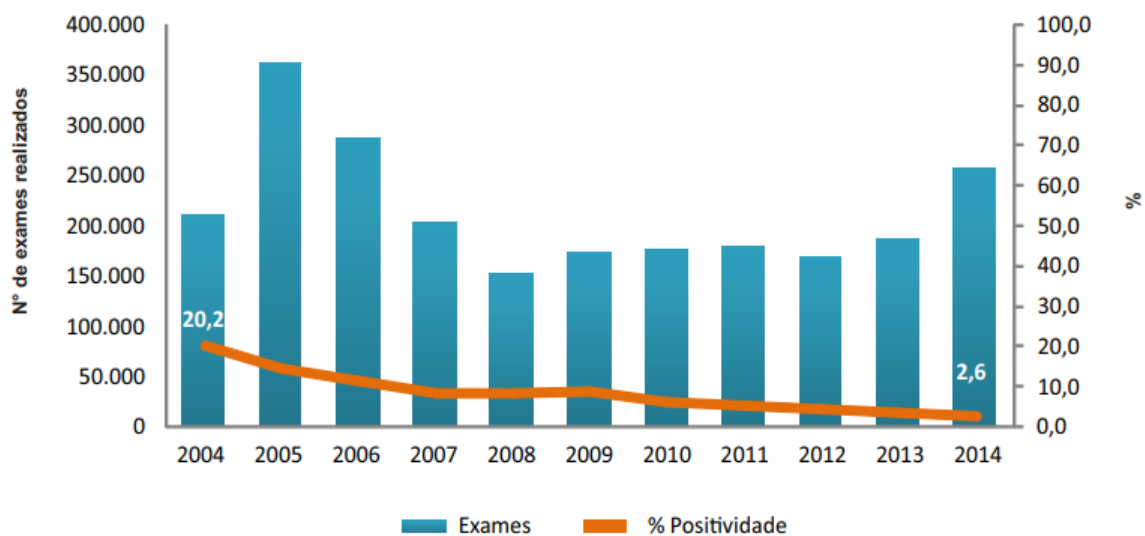
Nota: Nos estados da região Centro-Oeste não há busca ativa de casos, pois trata-se de uma área não endêmica, sem transmissão estabelecida da doença. Por isso, não há registros de caso.

Fonte: SISPCE/CGHDE/SVS/MS

Em 2011, foi implantado em Pernambuco o Programa de Enfrentamento a Doenças Negligenciadas (SANAR), com o intuito de reduzir ou eliminar doenças negligenciadas. No quadriênio de 2011-2014, o programa SANAR atuou em 108 municípios prioritários e de 2015-2018, ampliou para 144 municípios. A atuação desse programa consiste em atividades de rotina, como diagnóstico, tratamento e vigilância, além da educação em saúde e controle do hospedeiro intermediário (SES, 2015; BRITO *et al.*, 2020). O gráfico 1 apresenta a queda na taxa de positividade entre os anos de 2004 a 2014 em Pernambuco.



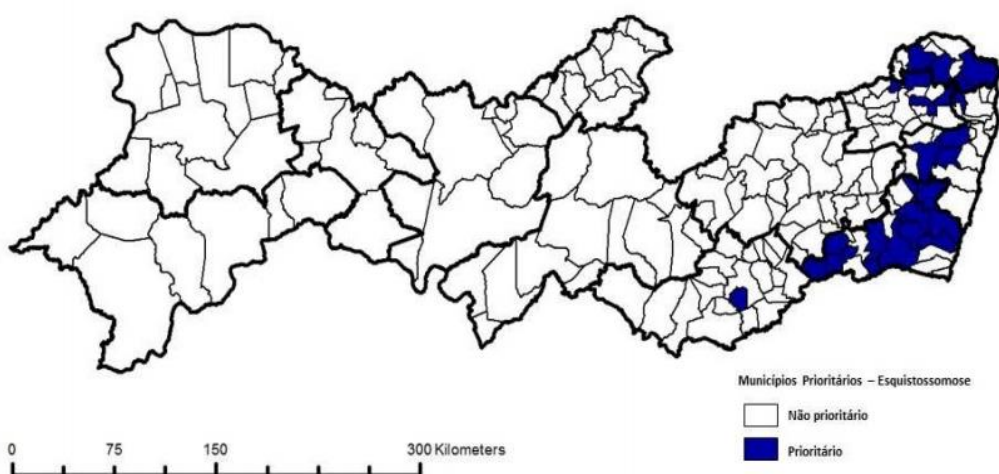
Gráfico 1 – Número de exames realizados e percentual de positividade para esquistossomose. Pernambuco, 2004-2014



Fonte: SISPCE/SEVS/SES-PE

A distribuição geográfica dos municípios prioritários para esquistossomose no plano de 2015-2018 está representada na figura 5. O foco do programa nos anos de 2015 a 2018 consistiu nos municípios com índice de positividade  $\geq 10\%$ , com no mínimo dois anos no quadriênio de 2011 a 2014.

Figura 3 – Distribuição geográfica dos municípios prioritários para esquistossomose. Pernambuco, 2015



Fonte: SANAR/SEVS/SES-PE

Fonte: SANAR/SEVS/SES-PE

#### 4.3 CICLO EVOLUTIVO, TRANSMISSÃO E ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

O agente infeccioso da esquistossomose é um trematódeo do gênero *Schistosoma*, podendo ser das espécies *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. malayensis*. Dessas espécies, as mais importantes clinicamente são *S. haematobium*, por causar a esquistossomose urogênica, e *S. mansoni* e *S. japonicum*, responsáveis por provocar lesões no fígado, baço e intestino, caracterizando as formas crônicas: hepática, hepatointestinal e hepatoesplênica, muito frequentes em áreas endêmicas (NOYA, 2015). Entretanto, esta revisão de literatura será focada na infecção por *S. mansoni*, devido a esta ser a única espécie transmitida no Brasil.

O contato com o agente infeccioso se dá através da pele, em rio, lago ou mesmo em água empoçada, apresentando cercarias, que é a forma infectante para o homem. Entretanto, a manutenção das formas infectantes nesse local depende de caramujos do gênero *Biomphalaria*, infectados com as formas larvais do *Schistosoma* (LOVERDE, 2019). Dessa forma, o ciclo do esquistossomo é dividido entre dois tipos: o hospedeiro intermediário (caramujo) e o hospedeiro definitivo (humanos) (figura 6).

Locais onde há presença do caramujo infectado são chamados de focos potenciais, quando somente é encontrado DNA do *S. mansoni* nos caramujos coletados, e focos de transmissão, quando os caramujos encontrados liberam cercarias. Esses locais coincidem com falta de saneamento e água encanada em comunidades urbanas ou rurais (GOMES *et al.*, 2017).

Ciclo no hospedeiro intermediário: Os caramujos são infectados por miracídios, que eclodem do ovo presente nas fezes liberadas nas águas, ao penetrar nas partes moles do caramujo, o miracídio se transforma durante 48 horas, em esporocisto primário. Os esporocistos primários irão sofrer sucessivas multiplicações em seu interior, originando esporocistos secundários por poliembrião. Aproximadamente a partir do décimo terceiro dia de infecção, os esporocistos secundários migram para o hepatopâncreas (glândulas digestivas) e o ovotestis do molusco, e se diferenciam em cercárias, mas alguns esporocistos secundários se

diferenciam em esporocistos terciários, quaternários, etc. que se mantêm no molusco, e quando o ambiente é favorável, novas cercárias são liberadas, portanto, uma vez que o molusco é infectado, continuará sendo até o final de sua vida (SILVA *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2017; MCMANUS *et al.*, 2020).

Ciclo no hospedeiro definitivo: As cercárias liberadas quando encontram a pele de um hospedeiro, se fixam pela ventosa oral e liberam metaloproteinases, penetrando no tegumento até encontrar a circulação. Esta atividade pode provocar uma reação de hipersensibilidade e causar lesões pruriginosas maculopapulares, denominadas de dermatite cercariana, pouco aparentes em áreas endêmicas com alta taxa de reinfecções. Ao penetrar na pele, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos e através da circulação venosa, os esquistossômulos migram para o pulmão. Nesta fase, alguns indivíduos apresentam sintomas clínicos, como tosse seca e infiltrados irregulares no pulmão podem ser vistos por radiografia do tórax (NOYA, 2015).

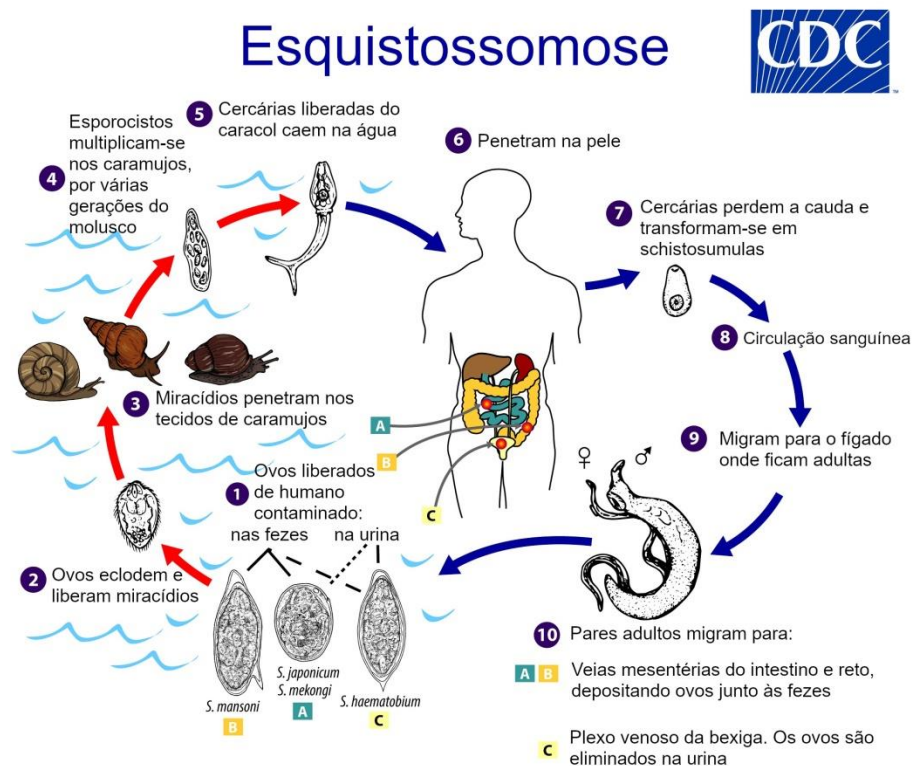
Do pulmão, as larvas migram para o coração esquerdo, e seguindo pela circulação, atingem as veias mesentéricas do sistema hepático, onde se transformam em vermes adultos, se acasalam liberando ovos nos capilares venosos que irrigam o intestino. Ao atravessarem o intestino, os ovos encontram a luz intestinal e são liberados junto com as fezes para o meio externo, reiniciando o ciclo. Nessas primeiras fases, até o quarto mês desde a infecção, é estabelecido a fase aguda da doença e o paciente pode apresentar também dores abdominais, diarreia, astenia, dor de cabeça, febre e eosinofilia, em decorrência dos antígenos liberados na circulação pelas larvas antes de se tornarem adultas, até após a forma adulta com liberação dos ovos, que também excretam antígenos solúveis (GRYSEELS *et al.*, 2006; MCMANUS *et al.*, 2020).

Com a frequente oviposição das fêmeas, os ovos se acumulam nos capilares venosos, aumentando a pressão sanguínea no sistema porta. Os antígenos liberados pelos ovos induzem uma resposta de células Th2, que medeiam a formação de granulomas. Nessa fase, as dores abdominais podem se intensificar, o paciente fica pálido e apresenta hepatoesplenomegalia. Trata-se de um quadro desencadeado por hipersensibilidade, caracterizando a fase aguda da doença pós-postural, ou seja, após a liberação dos ovos. Ao passar dos 4 meses, os granulomas formados no fígado ativam células estreladas hepáticas pela liberação de citocinas

pró-inflamatórias por eosinófilos e macrófagos, o processo de fibrose é desencadeado e se intensifica, caracterizando as formas crônicas (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; NOYA, 2015; ZHENG *et al.*, 2020).

Segundo o Ministério da Saúde, as formas crônicas da doença podem ser classificadas como hepática, com presença de tecido fibrótico no fígado (moderada e raramente grave), permitindo ser palpável na anamnese, mas não apresenta esplenomegalia; na forma hepatointestinal, embora o fígado não seja palpável, na ultrassonografia são vistos granulomas, havendo o acometimento principalmente do intestino; nessa fase, o paciente tem sintomatologias gerais associadas à anemia, e sintomas digestivos, alternando entre diarréias e constipações. Também pode ocorrer a forma hepatoesplênica, acometendo o fígado e o baço, com fibrose hepática grave, denominada de fibrose de Symers, acompanhada pela esplenomegalia (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; GOMES *et al.*, 2017; BRASIL, 2014).

Figura 4 – Ciclo de vida do parasita



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (DPDx). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>.

Quando nessa forma há varizes esofágicas, pode ocorrer hemorragia digestiva alta, dificultando a recuperação do tecido. A forma hepatoesplênica pode ser subdividida em *compensada*, quando o fígado ainda é capaz de realizar suas funções, mesmo estando comprometido. E *descompensada*, quando há uma grave perda funcional. Tratando-se de uma doença granulomatosa, a esquistossomose pode evoluir para a forma pseudoneoplásica (menos frequente), e pode ocorrer em tecidos fora da região abdominal, como no cérebro e na medula espinhal (formas ectópicas) (GOMES *et al.*, 2017; BRASIL, 2014).

#### 4.4 TRATAMENTO

Os primeiros ensaios de tratamento para esquistossomose eficazes surgiram com o uso de antimoniais trivalentes. Em 1924 foi utilizado em larga escala pelo Serviço de Saúde da Marinha do Brasil o antimonial tártaro emético, outros antimoniais foram sendo descobertos. Entretanto, todos esses compostos eram extremamente tóxicos e dolorosos quando aplicados via intramuscular (COURA & CONCEIÇÃO, 2010).

Estudos com hidroximetilação, em 1960, permitiram o desenvolvimento da hancantona (UK 3883) com eficácia de 90%, mas o uso desta droga foi abandonado devido ao potencial de provocar necrose hepática aguda (ANDRADE *et al.*, 1974). A esperança para o tratamento da esquistossomose surgiu na década de 70, com a descoberta da oxidação de UK 3883 pelo fungo *Aspergillus sclerotiorum*, fazendo que o composto químico apresentasse efeitos adversos quase nulos. Dos poucos efeitos adversos apresentados com maior frequência foram náuseas, tonturas e dores de cabeça. Esse novo medicamento foi chamado de oxamniquina, podendo ser aplicado em dose oral única (12,5-15 mg/kg para adultos e 15-20 mg/kg para crianças) (COURA & CONCEIÇÃO, 2010).

Apesar de a oxamniquina ter representado um grande avanço no controle da esquistossomose, outro medicamento formulado com a proposta de novos tranquilizantes, tomou maior espaço no mercado, podendo ser utilizado contra cisticercose, teníase e esquistossomose provocada por diferentes espécies (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*). Trata-se do Praziquantel (PZQ), um composto químico do grupo pirazinoisoquinolina. Segundo a bula do medicamento produzido pela farmaguinhos no Brasil, a recomendação de uso é 40 mg/kg, por via oral, em dose única, ou 20 mg/kg, por via oral, 03 (três)

vezes durante um dia, em intervalos de (4 a 6) horas (COURA & CONCEIÇÃO, 2010; UTZINGER *et al*, 2003).

Enquanto a oxamminiquina provoca lesões no tegumento dos vermes e inibe a oviposição, o PZQ age provocando paralisia espástica no parasita, seguida de extensa lesão tegumentar, sua ação são exercidas contra parasitas adultos, esquistosomulos muito jovens e cercarias. Embora o PZQ tenha sido usado por mais de 40 anos o mecanismo de ação não foi completamente elucidado, alguns estudos sugerem que o PZQ perturba a homeostase do íon cálcio, outros sugerem uma ação nas cadeias leves de miosina e captação de adenosina (THOMAS & TIMSON, 2020; UTZINGER *et al*, 2003).

Segundo o guia de controle e eliminação da esquistossomose humana, publicado pela OMS em 2022, áreas endêmicas com prevalência de infecção por *Schistosoma spp* maior ou igual que 10%, deve receber quimioterapia com dose única de PZQ para todas as idades acima de 2 anos de idade, até mesmo mulheres grávidas após o primeiro trimestre de gravidez, com cobertura da área igual ou acima de 75%. Nos casos, em que essas comunidades não demonstrarem resposta a quimioterapia anual com redução nos índices de infecção, a quimioterapia deve estender-se para duas vezes ao ano (OMS 2022).

Apesar das recomendações da OMS, é um desafio combater esquistossomose, principalmente em comunidades com alta taxa de transmissão e carga parasitária alta, pois o Praziquantel não previne reinfecções, e a quimioterapia é custosa para algumas populações que sofre com a doença em países pobres, não alcançando a cobertura satisfatória. Além disso, a quimioterapia em massa não é a única ferramenta contra a doença, como também se faz necessário o controle do hospedeiro intermediário, intervenções ambientais e hídricas para fornecimento de água potável e saneamento básico, e medidas de educação (OMS 2022).

#### 4.5 IMUNOPATOGENESE NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A resposta imune tem início nas primeiras semanas (1 a 2 semanas) de infecção, em resposta à invasão cercariana. Durante a migração dos esquistossômulos na corrente sanguínea, a resposta passa a ser mediada pelos

linfócitos T helper 1 (Th1), estes, por sua vez, liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-2, INF- $\gamma$ ), que auxiliam principalmente na resposta imune celular, resultando em eosinofilia acentuada e ativando macrófagos para combater a infecção (HIATT *et al.*, 1979).

Os eosinófilos e macrófagos são responsáveis pela liberação de quimiocinas CCL2 e CCL3 encontradas no soro de indivíduos com esquistossomose aguda, que aumentam o influxo de monócitos e eosinófilos (SILVEIRA-LEMOS, 2010).

A maioria das quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL12, CXCL5, CCR2, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR6) de células estreladas hepáticas são liberadas 3 semanas pós-infecção, antes do início da formação dos granulomas, no entanto, 6 semanas pós-infecção, algumas dessas quimiocinas são reguladas negativamente (CCL3, CXCL9, CXCL10 e CXCL11) (LIANG *et al.*, 2012).

Quando os esquistossômulos alcançam as veias mesentéricas do sistema hepático, se transformam em formas adultas e produzem ovos (3-5 semanas), os quais liberam antígenos solúveis (do inglês SEA – Soluble Eggs Antigen) (HIATT *et al.*, 1979). Estes antígenos induzem diretamente as células TCD4<sup>+</sup> a expressarem TGF- $\beta$  na superfície, e por meio desse mecanismo, as células TCD4<sup>+</sup> se comunicam com células T regulatórias (Tregs), induzindo a diferenciação em Treg Foxp3<sup>+</sup>. Um estudo demonstrou que a expressão de Foxp3 aumenta em 10 vezes após oito semanas de infecção para 30 vezes após dezesseis semanas de infecção. Coincidindo com o aumento na expressão de Foxp-3, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, INF- $\gamma$  e TNF diminuíram significativamente, enquanto os níveis de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- $\beta$  foram significativamente aumentados (EL-AHWANY *et al.*, 2012).

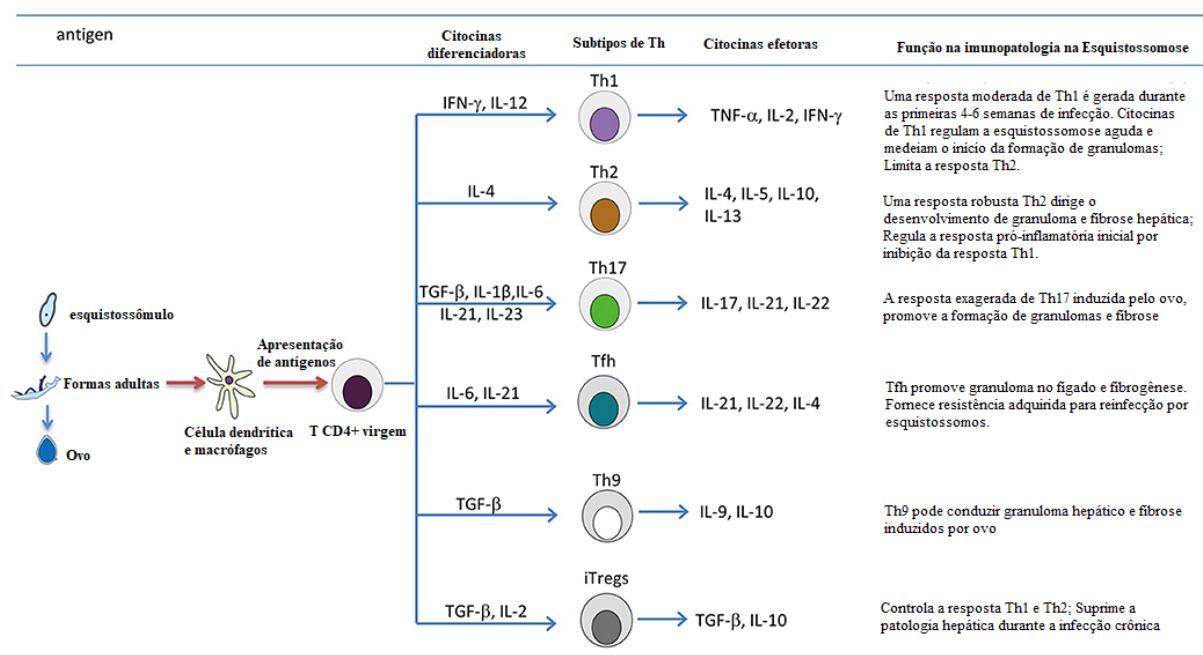
Células Dendríticas originárias da medula óssea (BMDC- Bone Medule Dendritic Cell) são responsáveis pelo aumento de IL-2 e IL-10 em resposta ao SEA, e as Tregs Foxp3<sup>+</sup> também induzem a expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ . Essas citocinas regulam negativamente a resposta inflamatória Th1 e induzem a diferenciação de Th2 (EL-AHWANY *et al.*, 2012; ONDIGO *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2006).

As Th2 liberam quimiocinas como CCL11 e CCL17, induzindo a migração de eosinófilos da corrente sanguínea para o local de inflamação, progredindo com a formação do granuloma hepático. Ademais, liberam interleucinas anti-inflamatórias

IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que também regulam negativamente a ação das interleucinas da reposta Th1 pró-inflamatória. Sem esta atividade, o fígado estaria exposto a uma elevada hepatotoxicidade. (LOVERDE, 2019; PEARCE, *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 2020).

Entretanto, as interleucinas liberadas pela linhagem celular Th2, principalmente IL-4 e IL-13, induzem uma mudança conformacional na linhagem de macrófagos, para macrófagos alternadamente ativados (AAM/M2), expressando na membrana arginase-1 (Arg-1), Ym-1, e Fizzl. Esses macrófagos são responsáveis por induzir a ativação de células estreladas hepáticas, produção e deposição de colágeno, contribuindo com a fibrose hepática (GORDON, 2003). A hemozoína, produto derivado do verme adulto, também pode desempenhar um papel na ativação de macrófagos AAM/M2 pela interação com receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) (ANTHONY *et al.*, 2011).

Figura 5 – Subtipos de células Thelper's (auxiliares) e função na imunopatogênese.



Fonte: Zheng et al. Front. Immunol. 18 February 2020

Curiosamente, após 20 semanas de infecção, a proporção de células Treg torna-se maior do que a proporção de células TCD4<sup>+</sup> para controlar a resposta Th2 durante a fase crônica. Um estudo conduzido com camundongos infectados com *S. mansoni* demonstrou que camundongos com síndrome de esplenomegalia moderada, que se assemelha a forma intestinal da esquistossomose mansônica



humana, apresentaram mais células T reg do que TCD4<sup>+</sup> após 20 dias de infecção, e estes, por outro lado, produzem mais IFN- $\gamma$ , comparado a camundongos com síndrome de hiperesplenomegalia, compatível com a forma hepatoesplênica grave (WATANABE K. *et al.*, 2009).

Alguns estudos relatam que após o tratamento contra o verme, a resposta Th1, principalmente os níveis de IFN- $\gamma$  aumentam, seja no soro 2 dias após tratamento com Praziquantel em modelo experimental com esquistossomose mansônica aguda (SHARAF *et al.*, 2022), ou no sangue total de pacientes agudos 6 meses após tratamento com oxamniquina (DE SOUZA *et al.*, 2007). Níveis significativamente aumentados de IFN- $\gamma$  também foram vistos em Células Mononucleares do Sangue (PBMCs) coletadas 1 e 6 semanas após terapia, e depois de serem estimuladas *in vitro* com antígenos de *S. mansoni* em pacientes agudos de área endêmica (CORRÊA-OLIVEIRA, *et al.*, 2000).

Análises de resposta celular e humoral de indivíduos em áreas endêmicas na Bahia e em Minas Gerais (Brasil), que não se infectaram com *S. mansoni*, demonstraram que altos níveis de IFN- $\gamma$  são secretados por PBMC após estimulação de antígenos do ovo e do verme adulto, *in vitro*, quando comparado a PBMCs de indivíduos infectados das mesmas áreas. Sugerindo que a presença de IFN- $\gamma$  pode contribuir com resistência à infecção (CORRÊA-OLIVEIRA, *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

## 4.6 DIAGNÓSTICO

### 4.6.1 Métodos Diretos

Os métodos diretos consistem na busca ativa pelo ovo do *Schistosoma mansoni*. Nos laboratórios de análises clínicas, o método mais utilizado é de sedimentação, ou de Lutz, também conhecido como Hoffman, mas esta técnica é apenas qualitativa e não permite a contagem dos ovos. Outras técnicas qualitativas que podem ser utilizadas são ELISA de captura e PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase). O primeiro consiste na busca por antígenos circulantes do ovo, e o segundo na detecção do DNA do parasita (BRASIL, 2014).

A técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e utilizada nos programas de controle é o Kato-Katz, pois é uma técnica qualitativa e quantitativa. Essa contagem dos ovos é crucial para o acompanhamento do paciente, quanto à parasitemia, e para o controle epidemiológico, sabendo que quanto mais ovos forem liberados nas fezes, mais ovos estarão no ambiente para realizarem o ciclo parasitário e maior será a endemicidade do município. Devido a isso, cada município faz a contagem dos ovos de cada paciente positivo e as Gerências Regionais de Saúde (GERES) realizam o controle de qualidade dos municípios e, posteriormente, o Laboratório Central de Endemias confere a contagem realizada pelas GERES e pelos municípios (KATZ, 2018).

A biópsia também é um método de diagnóstico direto, embora seja muito invasiva, sendo utilizada em casos avançados como diagnóstico diferencial. Esta pode ser realizada com a retirada de fragmentos da mucosa retal, permitindo a classificação e a contagem dos ovos encontrados no fragmento (oograma). A biópsia retal também é realizada em teste de eficácia de algum tratamento, mas é raramente utilizada. A biópsia hepática é a mais comum, e é realizada em casos de esquistossomose hepatoesplênica, pois nessa forma, a presença de ovos nas fezes é escassa. Os achados na biópsia hepática podem confirmar o diagnóstico de esquistossomose e descartar outras hepatopatias, por meio de evidências de ovos nos granulomas e do pigmento esquistossomótico, regurgitado pelo parasita na circulação, que se acumulam nas células de Kupffer e no tecido conjuntivo hepático (MS, 2014; GOMES *et al.*, 2017).

#### **4.6.2 Métodos Indiretos**

Os métodos indiretos consistem em ensaios imunológicos (ELISA, Imunofluorescência e Reação Periovular), mas são pouco realizados na rotina, devido à exigência de equipamentos e à complexidade. Outro ponto importante é que a positividade não indica infecção ativa, uma vez que os anticorpos podem permanecer no organismo por muito tempo. Ademais, estes métodos podem ser

utilizados em casos clínicos isolados de difícil diagnóstico e podem ser úteis em casos de viajantes de origem de áreas não endêmicas, que tiveram contato com águas em locais de foco. Podem ser úteis também na complementação de exames em áreas de baixa prevalência e cargas parasitárias pequenas (BRASIL, 2014).

#### 4.7 PROGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA MORBIDADE

Em áreas endêmicas, cuja prevalência das formas crônicas é maior devido aos altos índices de reinfecção e demora ao atendimento médico, a utilização de métodos de prognóstico é necessária, haja vista que muitos pacientes no momento do diagnóstico estão com o quadro avançado, necessitando de maior atenção. Os métodos para avaliação da morbidade são focados nos graus de comprometimento hepático, esplênico e no sistema portal, devido às lesões provocadas pela oviposição das fêmeas nesta região. Entretanto, também pode ser utilizado para avaliação de lesões não portais, como no pulmão e no sistema nervoso (GOMES *et al.*, 2017). Os métodos utilizados como prognóstico serão discutidos adiante.

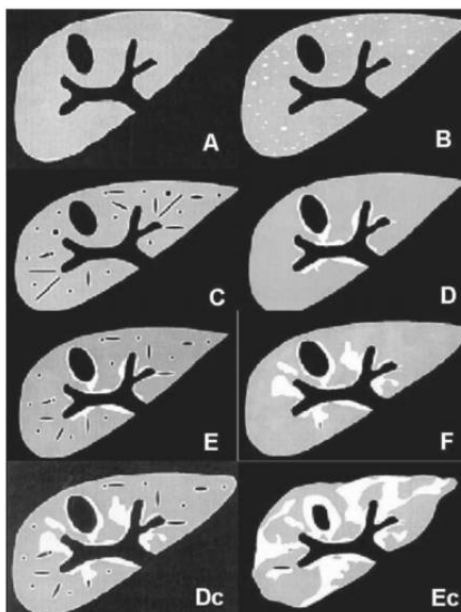
##### 4.7.1 Endoscopia, Ressonância Magnética E Ultrassonografia

A Endoscopia Digestiva Alta é recomendada no diagnóstico de varizes gastroesofágicas, devido à hipertensão portal, na forma hepatoesplênica da esquistossomose. A ressonância magnética permite a definição dos graus de fibrose hepática, com imagens de alta definição, entretanto, é uma técnica que depende do equipamento que nem sempre está disponível. Por outro lado, a ultrassonografia permite a classificação de igual modo, e o equipamento é mais acessível, podendo ser móvel. A desvantagem da ultrassonografia é a dependência de um médico treinado para o diagnóstico (BRASIL, 2014; GOMES *et al.*, 2017).

A classificação de Niamey é uma metodologia desenvolvida a partir da ultrassonografia, classificando de A a F os graus de fibrose hepática. Podendo ser normal (A), caso não seja evidenciada nenhuma alteração; Duvidosa (B), com focos ecogênicos difusos; Periférica (C), caso sejam aparentes ecos em anéis no

parênquima, semelhantes à haste de cachimbos; Central (D), quando a fibrose se situa junto à bifurcação portal; Focal Avançada (E), nos casos onde a fibrose irradia dos vasos para o parênquima; ou Muito Avançada (F), com bandas altamente ecogênicas. Ainda é possível serem vistas formas combinadas entre D e C, ou entre E e C (figura 9) (RICHTER, J. *et al.* 1996; RICHTER, J. *et al.* 2001).

Figura 6 – Classificação de Niamey para fibrose em esquistossomose



Fonte: RICHTER et al. Second international workshop, 1996, Niamey, Niger. World Health Organization, 2000.

#### 4.7.2 Marcadores Séricos De Dano Hepático

##### 4.7.2.1 Fosfatase Alcalina (ALP); Bilirrubina e Gama Glutamil Transferase (GGT)

A compressão de pequenos ductos biliares por granulomas esquistossomóticos pode resultar em alterações nas enzimas Fosfatase Alcalina (ALP) e em Gama Glutamil Transferase (GGT). ALP e GGT podem ser utilizadas como marcadores em pacientes cronicamente infectados em áreas endêmicas, estando com seus níveis elevados na forma hepatoesplênica descompensada. Um estudo com 81 casos de esquistossomose mansônica hepatoesplênica tiveram os níveis séricos elevados de ALP na metade desses pacientes, em que 20% deles

apresentaram 2,5 vezes maiores que os limites máximos. Após a terapia, em longo prazo, os valores da ALP voltam ao normal (BARRETO, 1971).

#### 4.7.2.2 FIB-4 e APRI

O Índice de Relação de Aspartato AminoTransferase (AST)/Plaquetas (APRI do inglês *AST to Platelet Ratio Index*) é um índice utilizado como preditor de fibrose hepática e apresenta uma sensibilidade de 77% e especificidade para fibrose de 72%, quando o valor calculado é maior que 0,7 (LIN *et al.*, 2011). A especificidade para cirrose alcança aproximadamente 91% quando o valor de corte é aproximadamente 2,0 (CHOU; WASSON, 2013). Quanto mais baixo é o valor de APRI (menor que 0,5), maior é o valor preditivo negativa cirrose hepática. Estudos em pacientes com esquistossomose mostraram que os valores de APRI foram significativamente associados com fibrose (DERBALA *et al.*, 2015; LAMBERTUCCI *et al.*, 2007).

Semelhantemente, o índice Fibrose 4 (FIB-4 do inglês *Fibrosis 4*) contribui para estimar o valor preditivo para fibrose e cirrose. Um valor de FIB-4 acima de 3,25 tem uma especificidade de 97% e um valor preditivo de 65% para fibrose avançada, um valor de corte inferior a <1,45 tem um valor preditivo de 90% para fibrose avançada (STERLING *et al.*, 2006). Valores de FIB-4 também podem ser utilizados para predizer graus de varizes esofágicas (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

O APRI e o FIB-4, utilizados em conjunto, fornecem uma avaliação da morbidade melhor do que usados sozinhos. E ambos contribuem para substituir a biópsia, sendo um método não invasivo. E assim, o médico pode acompanhar melhor o quadro clínico do paciente. As figuras 10 e 11 ilustram o cálculo de APRI e FIB-4, respectivamente.

Figura 1 – Fórmula para calcular o valor de APRI

$$\text{APRI} = \frac{\frac{\text{Nível AST (IU/L)}}{\text{AST (Limite Superior do Normal) (IU/L)}}}{\text{Contagem de plaquetas (10}^9\text{/L)}} \times 100 =$$

Fonte: <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/clinical-calculators/apri>

Figura 8 – Fórmula para calcular o valor de APRI

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Age (years)} \times \text{AST Level (U/L)}}{\text{Platelet Count (10}^9\text{/L)} \times \sqrt{\text{ALT (U/L)}} =$$

Fonte: <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/clinical-calculators/fib-4>

#### 4.7.2.3 Ferritina

Estudos destacam que a ferritina pode ser utilizada como preditora de gravidade de dano hepático na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGN), apresentando níveis elevados nesses pacientes com DHGN e síndrome metabólica, em cerca de 30-40% dos casos. A ferritina é capaz de sinalizar a inflamação ativando as vias PI3K/Akt e da MAP quinase nas células estreladas hepáticas, que, por sua vez, ativam a atividade de NF-κB, regulando positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (HAGHOO *et al.*, 2019; RUDDELL, *et al* 2009). Entretanto, a relação entre a ferritina e fibrose hepática na esquistossomose precisa ser mais bem estudada.

#### 4.8 MICRORNAS

Os microRNAs fazem parte de uma classe de RNAs de curto comprimento (SmallRNAs), de aproximadamente 12 nucleotídeos, os quais são reguladores pós transcricionais. Os genes de origem dos microRNAs são regiões não traduzidas, entretanto, estes genes são transcritos pela polimerase II em transcritos primários (pri-miRNA) de 70 nucleotídeos de comprimento. Estes apresentam um formato stem-loop, ou seja, apresentam uma alça (*loop*) e um tronco (*stem*) de 33 a 35 pares de base. Antes de migrar para o citoplasma, devem ser processados ainda no núcleo pelas proteínas Drosha e Pasha, gerando um precursor – pre-miRNA, depois é clivado pela proteína Dicer, eliminando a alça do pre-miRNA, e restando apenas um duplex de microRNA, que após ser metilado pela enzima Hsa Enhancer 1, é levado para o citoplasma pela Exportina 5, através de um poro nuclear. No citoplasma, o duplex é desfeito e apenas a fita guia é escolhida seletivamente, por apresentar menor estabilidade na região 5', para se ligar ao complexo proteico denominado RISC (RNA-Induced Silencing Complex) através de proteínas Argonautas. Com a ligação a esse complexo, o miRNA maduro é capaz de impedir a tradução de um RNA mensageiro (mRNA) ligando-se à região alvo deste, ou por meio do processo de deadenilação da cadeia poli A na cauda do mRNA (AMBROS, 2004; ANDREOLI, 2014).

Os microRNAs podem ser encontrados em diversos fluidos corporais, podendo estar presentes no meio extracelular ou podem ser capturados por outras células. A estabilidade dos microRNAs no meio extracelular é possível por meio da ligação com um complexo de proteínas Argonautas, ou através da ligação de lipoproteínas de alta densidade. Além disso, os microRNAs também podem ser exportados da célula por meio de microvesículas, conhecidas como exossomos. O curto comprimento dos microRNAs também confere resistência à digestão de RNAses (AMBROS, 2004; WEBER, *et al.*, 2010; ANDREOLI, 2014; CAI *et al.*, 2018).

Foi relatado por Meningher *et al.* (2016) a presença de microRNAs, sendo expressos em vesículas isoladas do soro de 26 viajantes, de áreas endêmicas (África subsaariana e Laos), onde foram infectados por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. mekongi*. Quando comparados com indivíduos saudáveis, foi encontrada uma expressão significativa dos microRNAs: sma-bantam, sma-2c-3p, sma-2a-5p e miR sma-3488.

Em um estudo experimental, durante a infecção por *S. mansoni*, foi descoberta uma relação entre a expressão de microRNAs do parasita com o hospedeiro, podendo ser liberados por meio de vesículas ou diretamente do corpo para o meio extracelular, estando presentes no soro dos camundongos experimentados (SAMOIL *et al.*, 2018).

Após coletar formas adultas do *S. mansoni* de camundongos infectados, foi realizado um sequenciamento de microRNAs específicos de *S. mansoni*. O estudo encontrou cerca de 158 microRNAs do corpo inteiro do parasita e 143 de exossomos. Os microRNAs mais abundantes nas vesículas foram escolhidos para confirmação por qRT-PCR, comparados com camundongos não infectados, demonstrando uma amplificação significativa ( $p < 0,05$ ) de sma-miR-125b, sma-miR-71a, sma-miR-125a e sma-bantam. O microRNA sma-miR-125a apresenta mais de 600 alvos genéticos em humanos e sma-bantam tem 39 potenciais alvos (SAMOIL *et al.*, 2018).

Por outro lado, dentre os miRNAs mais expressos do corpo do verme adulto, o miR-10a-5p se destaca nos resultados de sequenciamento de estudos experimentais (SAMOIL, *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2020). Este miRNA tem como alvo o MAP3K7 e consequentemente regula negativamente a atividade de NF- $\kappa$ B, fator crítico na diferenciação e função de Th2 (MENINGER *et al.*, 2020)

Dessa forma, os microRNAs podem ser utilizados pelo parasita como fator de virulência e mecanismo de patogenicidade, entretanto, nesta relação, os esquistossomos não são os únicos a liberar os microRNAs. Da mesma forma, há relatos na literatura de alterações na expressão de microRNAs de origem humana, podendo modular os graus de fibrose hepática.

O mesmo miR-10a utilizado pelo parasita (sma-miR-10a) para silenciar a via Th2 (MENINGER *et al.*, 2020), é semelhantemente utilizado por células Treg Foxp3<sup>+</sup> do hospedeiro para silenciar a resposta Th1 e recrutar células Th2 na infecção por *S. mansoni* e *Leishmania major* (KELADA *et al.*, 2013). Ou seja, o análogo de miR-10a do hospedeiro realiza atividade contrária ao mecanismo imunológico, mas ambos tem função de regulação da resposta imune. O miR-10a de origem humana (hsa-miR-10a), apresenta atuação na via TGF $\beta$ , contribuindo com o aumento dos níveis de TGF $\beta$ 1, reduz a expressão de SMAD7, e inibe a expressão de TNF e IFN- $\gamma$  em células dendríticas, em Th1 e Th17, mas diferentemente do análogo de *S. mansoni* não suprime a função das Th2.



Esta atividade na via TGF $\beta$  por hsa-miR-10a pode ser responsável por contribuir na progressão de fibrose hepática, como referido no trabalho realizado por Cabantous *et al.* (2022) com 22 amostras de biópsia hepática de pacientes com esquistossomose japônica, indicados à esplenectomia na China. Foi encontrado no sequenciamento por RNA-seq o miR-10a sendo *upregulated* no tecido hepático destes pacientes com fibrose periférica leve ou ausente, e fibrose central no lobo esquerdo de espessura leve a moderada comparado com controles saudáveis.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal com comparação de grupos.

### 5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

As amostras foram obtidas a partir do inquérito populacional realizado em Porto de Galinhas (n=45), Pernambuco (Brasil), pelo Serviço de Referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM – Fiocruz). As 45 amostras foram armazenadas no biorrepositório, 30 pertenciam ao grupo de indivíduos com diagnóstico positivo para *S. mansoni* por Kato-katz e 15 pertenciam ao grupo de indivíduos sem infecção (controles). Os indivíduos que apresentaram amostras de fezes positivas para *S. mansoni* receberam tratamento com praziquantel e amostras foram coletadas antes e após 90 dias de tratamento.

### 5.3 CARGA PARASITÁRIA

Para definir o número de casos de esquistossomose e a carga parasitária dos indivíduos parasitados, foi realizado o diagnóstico parasitológico das fezes a partir do método Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972), com 1 amostra de cada paciente, da qual foram examinadas 2 lâminas.

A taxa de infecção humana ou carga parasitária de cada indivíduo foi definida multiplicando-se o número de ovos encontrados em cada lâmina pela constante 24, em que se obtém o número de ovos por grama de fezes (OPG). Como foram preparadas 2 lâminas para cada amostra, o resultado da carga parasitária para cada indivíduo constituiu-se da média aritmética do número de OPG das 2 lâminas examinadas. Com base nos parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (2002), a prevalência da infecção humana foi classificada em 3 categorias:

prevalência baixa (<10%), moderada (10% - 50%) e alta (>50%). Bem como a intensidade da infecção: Infecção: baixa (0-99 opg); moderada (100-399 opg); alta ( $\geq 400$  opg).

#### 5.4 GRUPOS DE ESTUDO

A doença esquistossomótica é decorrente das manifestações clínicas causadas pelos ovos, vermes e seus antígenos. É classificada em duas fases, inicial (aguda) e tardia (crônica), de acordo com o período evolutivo da doença, podendo ter apresentações assintomáticas, oligossintomáticas e sintomáticas. Dentro da fase crônica, há diversas formas clínicas de apresentação, dependendo do órgão mais acometido. A população (n=45) foi dividida em dois grupos de acordo com a classificação das principais manifestações das fases iniciais e tardias da esquistossomose.

Grupo 1 - Formas Crônicas (n=30): As formas crônicas foram classificadas pela avaliação clínica e por ultrassonografia, por meio da classificação de Niamey, podendo dividir aqueles com fibrose ausente ou duvidosa (A e B, respectivamente), Fibrose periférica leve (padrão C), fibrose central (padrão D), fibrose periportal avançada (padrão E), fibrose periportal muito avançada (padrão F) e as formas combinadas (DC, EC, FC). Dessa forma, é possível diagnosticar a forma hepatointestinal (HI), quando não há fibrose periportal, ou pode apresentar o padrão C, normalmente a área do cólon sigmoide pode ser palpável e é dolorosa. A forma hepática é caracterizada por fibrose periportal (padrões D e E) sem esplenomegalia. A forma hepatoesplênica (HE) apresenta fibrose periportal, geralmente nos padrões E ou F, com esplenomegalia, podendo ser HE Compensada, HE Descompensada ou HE Complicada (OMS, 2000).

Grupo 2 - Indivíduos controle (n=15): Neste grupo, foram considerados os indivíduos que apresentaram resultados negativos para presença de *Schistosoma mansoni*, por meio do método direto Kato-Katz, Nested PCR ou a partir de busca dos ovos nas fezes, e/ou por meio de imunodiagnóstico (ELISA) com pesquisa de antígenos circulantes em soro.

## 5.5 DOSAGEM DE MARCADORES DE DANO HEPÁTICO

As amostras de soro foram dosadas com o apoio do Laboratório do Hospital das Clínicas (Pernambuco - Brasil), para os seguintes marcadores bioquímicos de dano hepático: Ferritina, Bilirrubina Direta (DB), Bilirrubina Total, Fosfatase Alcalina (ALP), Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Gama Glutamil Transferase (GGT).

## 5.6 EXTRAÇÕES DE RNA, SINTESE DE cDNA E ENSAIO DE EXPRESSÃO

Inicialmente, foram isoladas células mononucleares de sangue total (PBMC), utilizando o método por gradiente de Ficoll Paque. A extração de RNA total, nessas células mononucleares isoladas, foi realizada com Trizol (Invitrogen).

Logo após a purificação do RNA total, o cDNA foi preparado com 10 ng de RNA total (em 5 ul) utilizando TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit com primer específico para o miR-10a (TaqMan™ Gene Expression Assay. Catálogo: 4331182). Para síntese de cDNA do INF- $\gamma$ , foi utilizado 2000 ng (2  $\mu$ g) de input de RNA em uma reação de 20ul, utilizando primers randomizados por meio do kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription). A expressão diferencial de miR-10a e IFN- $\gamma$  foi avaliada em indivíduos com esquistossomose e controles, utilizando Taqman MicroRNA Assay, seguindo instruções do fabricante no QuantStudio 5™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Os dados foram normalizados usando  $\beta$ - actin como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

## 5.7 PREDIÇÃO DE GENES E ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

A predição de genes alvos para o miR10a-3p humano foi realizada pelo banco de dados TargetScanHuman v.8.0 ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)). Todos os genes encontrados foram copiados para a plataforma de enriquecimento DAVID

(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), sendo escolhidos os dados de Vias de Sinalização por KEGG e Anotações Funcionais por UNIPROT. Foram consideradas apenas as informações com filtro de significância com  $p < 0,05$  e foi aplicado o teste de Benjamini-hochberg. Os gráficos foram realizados aplicando os dados no programa de estatística GraphPad Prism Software version 5.

## 5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os dados de expressão relativa do miR-10a, foi empregado o cálculo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para quantificação relativa da expressão, que pode ter valores modificados dependendo do grupo de escolha como referência para análise.

Para análise de distribuição de variáveis, foi utilizado *Shapiro–Wilk test*. Nas comparações entre amostras pareadas nos tempos antes e depois do tratamento de indivíduos infectados com *S. mansoni*, foi empregado o teste de *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* (bicaudal) e nas comparações com o grupo controle foi utilizado o teste *Unpaired t test*. Estas análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism Software version 5.

Para análise de correlação bivariada, foi utilizado o programa de estatística IBM SPSS Statistics v. 28.0.1.1 e foi empregado o coeficiente de correlação Spearman (bicaudal).

## 5.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães (CEP/IAM), de acordo com o previsto na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (ANEXO A). Os pacientes ou familiares, foram informados, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, para maiores de sete anos e menores de 18 anos. CA AE: 38302320.8.0000.5190.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A população do estudo foi constituída por 45 indivíduos residentes de Porto de Galinhas. Por tratar-se de uma área endêmica para esquistossomose, 23,3% dos indivíduos positivos para *S. mansoni* (n=30) declararam ter apresentado infecção prévia, em anos anteriores ao inquérito realizado pelo Instituto Aggeu Magalhães, e mais de 30% dos indivíduos controles com resultados negativos nos testes parasitológico, molecular e imunológico (n=15). Estes indivíduos também receberam tratamento em anos anteriores, através do programa SANAR da Secretaria do Estado de Pernambuco no intuito de reduzir ou eliminar a esquistossomose. Curiosamente, grande parcela dos indivíduos negativos para *S. mansoni* (73,4%) haviam recebido tratamento prévio, tendo apresentado Infecção Prévia ou não. Entretanto, neste estudo, apenas indivíduos com infecção ativa receberam terapia com Praziquantel.

A maior parte dos indivíduos com infecção ativa é do sexo masculino (66,7%) com idade mediana de 31 anos. 23,3% consumiam álcool e 26,7% apresentaram esteatose. Com relação à fibrose, a maior parte (76,7%) possuíam os padrões C, D e DC (Tabela 2).

Tabela 2 – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do estudo.

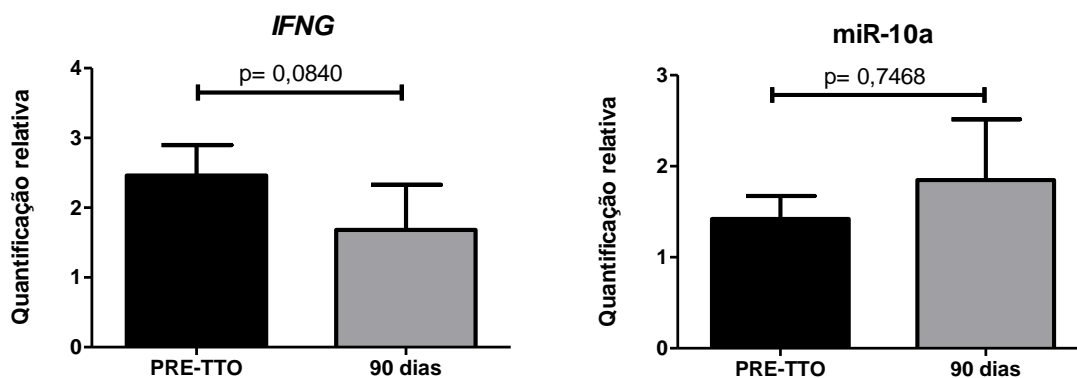
<b>Características clínicas</b>	Indivíduos positivos para <i>S. mansoni</i> N=30	Indivíduos negativos para <i>S. mansoni</i> N=15
Idade [Anos (mínimo-máximo)]	32,5 (9-69)	32 (12-58)
Gênero		
Masculino [n(%)]	20 (66,7%)	8 (53,4%)
Feminino [n(%)]	10 (33,3%)	7 (46,7%)
Infecção Prévia [n(%)]	7 (23,3%)	5 (33,4%)

Tratamento Prévio [n(%)]	8 (26,7%)	11 (73.4%)
Consumo de Álcool [n(%)]	7 (23,3%)	4 (26.7%)
Carga Parasitária [opg (mínimo-máximo)]	36 (1-1572)	0
Graus de Fibrose		
A-B [n(%)]	5 (16,7%)	9 (60%)
C-D/DC [n(%)]	23 (76,7%)	6 (40%)
E [n(%)]	2 (6,6%)	0
Esteatose [n(%)]	8 (26,7%)	2 (13.4%)
Veia Portal [D(DP)]	0.90 (IC95%: 0.85-0.96)	0.88 (IC95%: 0.81-0.94)

---

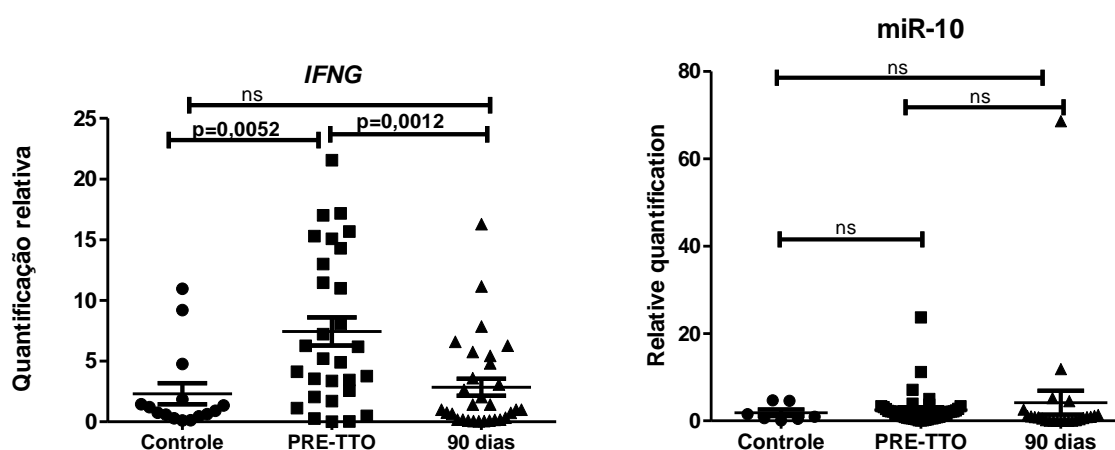
## 6.2 EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$ E MIR-10A

A expressão relativa de *IFNG* antes do tratamento (Pré-TTO) de indivíduos com infecção ativa foi maior do que após 90 dias de tratamento, mas não houve diferença significativa ( $p=0,084$ ). Enquanto a expressão relativa de miR-10a após o tratamento foi maior, no entanto, essa diferença também não foi estatisticamente significativa (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) da expressão de *IFNG* e miR-10a

Nota: Teste de Wilcoxon

No gráfico 3, o cálculo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi realizado assumindo a expressão relativa de indivíduos não infectados/controles (n=15) como referência. Os valores de IFN-gama de indivíduos Pré-TTO foram significativamente maiores do que controles e após o tratamento nesse cálculo (p=0,0052; IC=8,656-1,618 e p=0,0012; IC 95%=1,907-7,303, respectivamente).

Gráfico 3 – Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) da expressão de *IFNG* e miR-10a antes e após o tratamento com referência da expressão de amostras controles

Nota: Unpaired t test. ns=não significativo.

### 6.3 CORRELAÇÃO ENTRE MIR-10A, IFN- $\gamma$ , CARGA PARASITÁRIA, FIBROSE E TRATAMENTO



Não houve correlação entre o miR-10 e as variáveis investigadas (carga parasitária, tratamento e fibrose hepática), mas foi significativamente correlacionado com o IFN- $\gamma$  ( $p=0,001$ ;  $R= 0,482$ ), apresentando correlação positiva fraca (Quadro 1). E o IFN- $\gamma$  foi negativamente correlacionado com o tratamento, ou seja, após o tratamento diminui a expressão de IFN- $\gamma$  ( $p=0,043$ ;  $R=-0,228$ ), corroborando com os achados de associação no gráfico 3.

Quadro 1 – Testes de correlação entre *IFNG* e miR-10a

Spearman test	<i>IFNG</i>		miR-10a	
	R	p	R	p
<b>Carga parasitária</b>	0,079	0,622	0,235	0,138
<b>Fibrose hepática</b>	0,020	0,904	-0,151	0,354
<b>Tratamento</b>	-0,228	<b>0,043</b>	-0,210	0,091
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	1	-	0,482	<b>0,001</b>

Com relação aos marcadores hepáticos apenas a ferritina apresentou correlação positiva forte com a expressão de *IFNG* (Quadro 2).

Quadro 2 – Correlação entre Marcadores Bioquímicos de inflamação hepática com a expressão de *IFNG* e miR-10a

Marcadores Bioquímicos	<i>IFNG</i>		miR-10a	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
ALP (U/L)	-0,0819	0,6972	0,1291	0,5384
GGT (mg/dL)	-0,0894	0,6707	-0,1042	0,6203
TGO (U/L)	-0,2333	0,2616	0,1310	0,5326
TGP (U/L)	-0,2180	0,2952	-0,1806	0,3877
Ferritina (ng/dL)	<b>0,7210</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	-0,05283	0,8020

BT (mg/dL)	-0,1602	0,4444	0,3166	0,1232
BD (mg/dL)	-0,0970	0,6446	0,1163	0,5800

---

Nota: Pearson test (two-tailed)

#### 6.4 PREDIÇÃO DE GENES ALVOS DO MIR-10, ENRIQUECIMENTO DE VIAS MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E FUNÇÃO MOLECULAR DOS GENES.

Foram encontrados 3459 genes alvos do miR-10 por meio do TargetScan v. 8.0. O enriquecimento das vias moleculares encontrou 26 vias significativamente associadas aos genes alvos do miR-10. Dentre essas vias, destacamos a via de sinalização de TGF beta ( $p=0,0075$ ), envolvida da diferenciação de células estreladas hepáticas e fibrogênese. Também foram encontradas vias relacionadas ao Câncer ( $p=0,0018$ ), Carcinoma Hepatocellular ( $p=0,017$ ) e Regulação de Vias de Sinalização ( $p<0,001$ ) (Gráfico 4).

As funções moleculares estão, em grande parte, relacionadas à regulação da expressão gênica como ligação ao DNA, ligação ao RNA, Ativação e Repressão. Semelhantemente, os processos biológicos significativamente associados envolvem Regulação Transcricional, Regulação Transducional, Silenciamento Gênico mediado por RNA e processos envolvidos na Divisão Celular (Gráfico 5).

Gráfico 4 – Anotação de vias (KEGG) a partir do enriquecimento de genes alvos de miR-10a

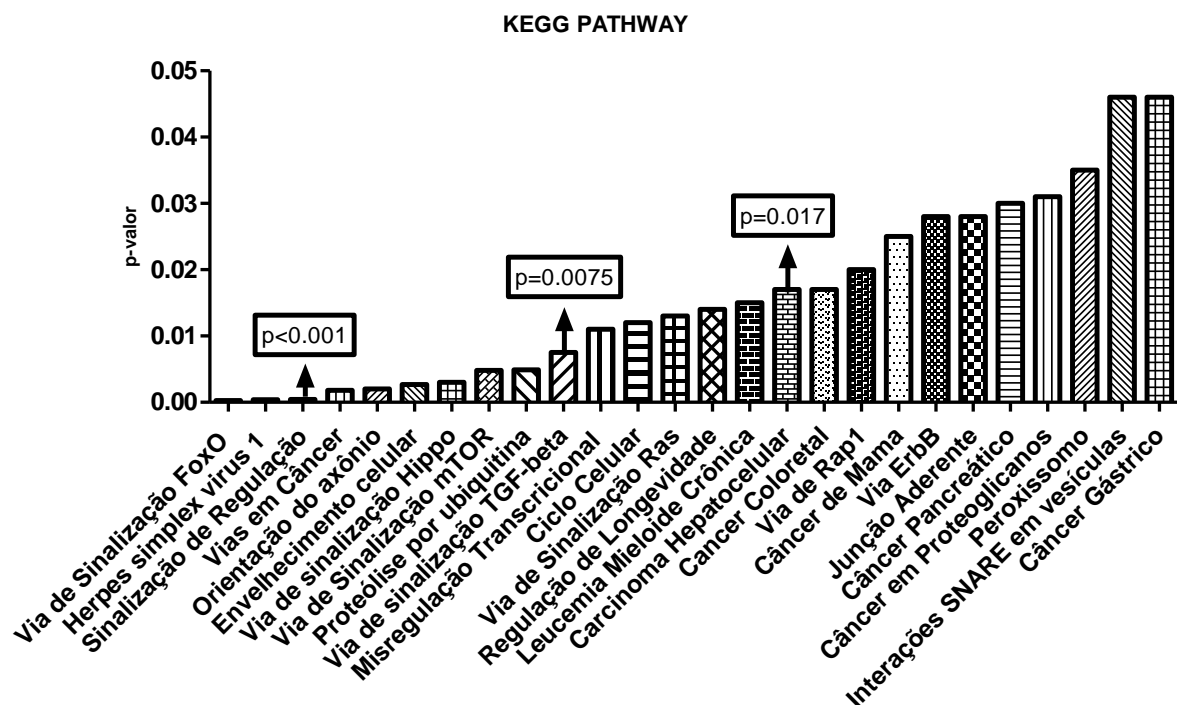
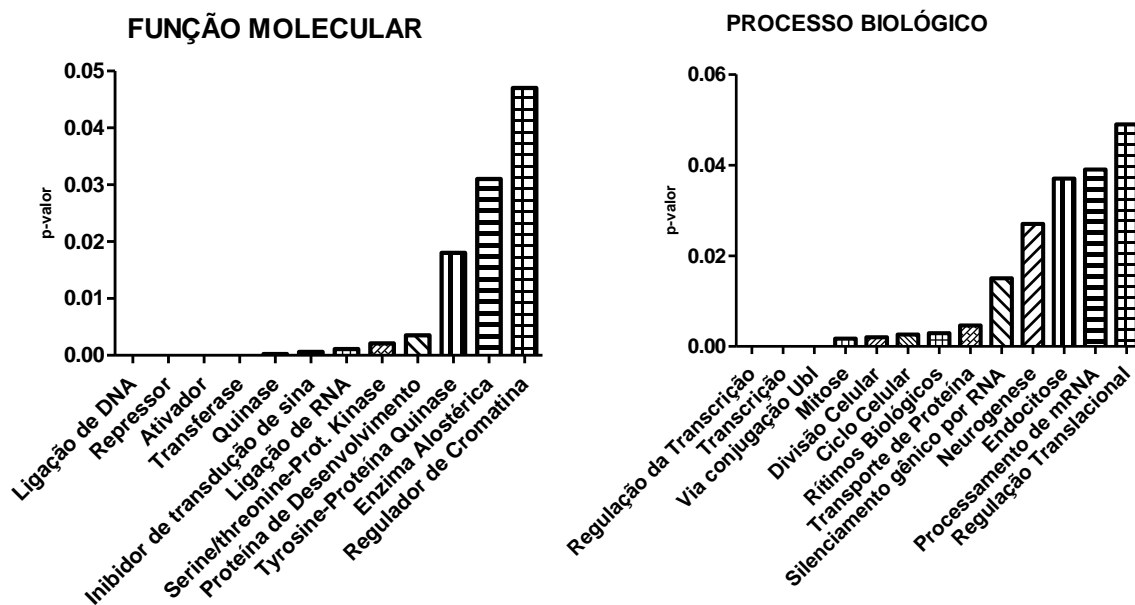


Gráfico 5 – Anotação Funcional (UNIPROT) a partir do enriquecimento de genes alvo de miR-10a



## 7. DISCUSSÃO

A regulação da patogênese na esquistossomose depende principalmente do equilíbrio da resposta imune pelas células TCD4+ classificadas como T helper (Th) 1 e Th2. A resposta imune na fase aguda é mediada principalmente pelas citocinas pró-inflamatórias Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 e IL-6), enquanto na fase crônica, pouco IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são produzidos, pois estes são regulados negativamente pela resposta Th2 (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13) (ZHENG *et al.*, 2020). Estudos revelam que mesmo após terapia contra o verme na fase aguda, a resposta por IFN- $\gamma$  permanece em resposta aos antígenos solúveis do ovo (SEA) (SHARAF *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2007; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2000).

No entanto, amostras de sangue de pacientes com fibrose hepatoesplênica e hepatointestinal após estimulação em meio RPMI com SEA e após neutralização de IL-13 mostraram níveis significativamente mais elevados de IFN- $\gamma$  em comparação com pacientes agudos (MORAIS *et al.*, 2011). Neste estudo, foi observado que os níveis de IFN- $\gamma$  são significativamente maiores em pacientes crônicos antes do tratamento com praziquantel do que 90 dias após o tratamento, mas não houve correlação entre IFN- $\gamma$  e grau de fibrose hepática, isso pode ser atribuído ao pequeno número de amostras quando os grupos de comparação foram distribuídos.

Estudos mostram que o IFN- $\gamma$  é capaz de impedir a progressão da fibrose por estimular células-tronco mesenquimais (MSCs) que impedem a ativação de fibroblastos e a expansão da matriz extracelular (KANAI *et al.*, 2021). O IFN- $\gamma$  também é capaz de inibir a sinalização do TGF- $\beta$ , por meio da fosforilação e ativação do fator de transcrição Stat1, que por sua vez induz a expressão de SMAD7 responsável por inibir a via do TGF- $\beta$  (KANAI *et al.*, 2021; ULLOA *et al.*, 1999).

Em nossos resultados não vimos correlação entre miR-10a e fibrose, mas na literatura foram encontradas associações desse microRNA no desenvolvimento de fibrose, contrariando o papel do IFN- $\gamma$ . Um estudo experimental usando fibroblastos hepáticos de 20 camundongos com fibrose induzida por tetracloreto de carbono mostrou que o miR-10a é altamente expresso neste grupo quando comparado à expressão de 20 amostras de tecido hepático de controles ( $-7,84 \pm 1,38$  vs.  $-9,97 \pm 1,59$ ,  $P < 0,05$ ). Além disso, os autores revelaram que o miR-10a é capaz de

aumentar a proliferação de fibroblastos. Quando os fibroblastos foram transferidos para cultura com a adição de miR-10a mimetizado, a concentração de TGF $\beta$ 1 aumentou significativamente, enquanto a expressão de SMAD7 (inibidor de TGF- $\beta$ ) diminuiu (ZHOU *et al.*, 2016).

Da mesma forma, em outro estudo com cultura de mucosa intestinal de pacientes com Doença de Crohn (Doença Inflamatória Intestinal) o TGF- $\beta$  foi capaz de aumentar a expressão do miR-10a enquanto o IFN- $\gamma$  e o TNF tiveram efeitos antagônicos, inibindo a expressão do miR-10a (WU *et al.*, 2015).

Cabantous *et al.* (2017) realizaram RNAseq com 22 amostras de biópsia hepática de indivíduos infectados por *Schistosoma japonicum* (na China), apresentando fibrose periférica leve ou ausente, e fibrose central no lobo esquerdo de espessura leve a moderada, e encontraram miR-10a significativamente *upregulated* em pacientes com fibrose hepática devido a esquistossomose em comparação com amostras de fígado de controle (doadores na França).

Ao contrário do estudo realizado por Cabantous *et al.* (2017) nosso estudo é o primeiro a investigar a expressão de miR-10a em PBMCs de pacientes com esquistossomose mansônica e comparar com os tempos antes e depois da administração de Praziquantel. Um estudo anterior investigou o perfil de expressão em células T isoladas de PBMCs e tecido hepático de camundongos infectados com *S. japonicum*. Segundo os autores, o miRNA-10a é co-detectado em células T originárias de PBMCs e do fígado, mas tem diferentes expressões, sendo mais expresso no fígado (GIRI *et al.*, 2022).

Dessa forma, investigar em células hepáticas a correlação do miR-10a com a fibrose, pode fornecer resultados melhores do que investigar em PBMCs. No entanto, devido ao pequeno número de indivíduos neste estudo para inferir o papel do miR-10a na fibrose e na regulação da resposta imune durante infecção por *S. mansoni*, mais estudos do tipo longitudinal deve ser realizado, avaliando também a expressão de *IFNG* com o tratamento de Praziquantel em populações endêmicas com histórico de reinfecções.

## 8. CONCLUSÃO

O miR-10a atua na regulação de genes alvos com atividade regulatória, associados ao câncer e na sinalização TGF- $\beta$ . Porém, apesar de atuar na regulação de genes alvos com atividade regulatória, o miR-10a não apresentou evidências como biomarcador de inflamação no acompanhamento terapêutico na esquistossomose em PBMCs, enquanto os níveis de expressão de IFN- $\gamma$  foram significativamente maiores antes do tratamento.

## REFERÊNCIAS

- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. Nature, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- ANDREOLI, S. C.S. *et al.* Utilização dos microRNAs no direcionamento da terapia e na avaliação da resposta ao tratamento do câncer colorretal. Einstein, v. 12, n. 2, p. 256-258, 2014.
- AYOYA, M. A. *et al.*  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein, hepcidin, C-reactive protein, and serum ferritin are correlated in anemic schoolchildren with *Schistosoma haematobium*. The American journal of clinical nutrition, v. 91, n. 6, p. 1784-1790, 2010.
- ANTHONY, B. J. *et al.* A role for peroxisome proliferator-activated receptors in the immunopathology of schistosomiasis?. PPAR research, v. 2012, 2011.
- ANDRADE, Z.A. *et al.* Lesões hepáticas produzidas por hycanthonne (Etrenol). Rev Inst Med Trop. Sao Paulo 16: 160-170, 1974.
- 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 geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_hanseníase.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseníase.pdf).
- BARRETO, A. V. M. S. Estudo de biomarcadores para morbidade e acompanhamento pós-terapêutico em pacientes com Esquistossomose mansoni. Tese (Doutorado em saúde pública) – Instituto Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018; 87 p.
- BARRETO V. S. T. Alkaline phosphatase in schistosomiasis. Annals of internal medicine, v. 74, n. 3, p. 450-451, 1971.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; E.T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. Journal of Advanced Research, Cairo, v4, p.433–444, 2013.
- BHARGAVA, A. *et al.* Anthelmintic treatment improves the hemoglobin and serum ferritin concentrations of Tanzanian schoolchildren. Food and nutrition bulletin, v. 24, n. 4, p. 332-342, 2003.
- BIHRER V. *et al.* Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. PLoS One. v6:e26971, 2011.
- BOROS, D. L.; AMSDEN, A. F.; HOOD, A. T. Modulation of granulomatous hypersensitivity. IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. The Journal of Immunology, v. 128, n. 3, p. 1050-1053, 1982.
- 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 geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância da esquistossomose mansoni. 4. ed. Brasília, DF, 144 p., 2014.

BRITO, M. I. B. S.; SILVA, M. B. A.; QUININO, L. R.. M. Situação epidemiológica e controle da esquistossomose em Pernambuco: estudo descritivo, 2010-2016. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 29, p. e2019252, 2020.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000600009>

COURA, José Rodrigues; CONCEIÇÃO, Maria José. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, p. 598-603, 2010.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. *et al.* Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. Acta tropica, v. 77, n. 1, p. 141-146, 2000.

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, v. 47, n. 13, p. 823-830, 2017.

CAI, P. Circulating miRNAs as footprints for liver fibrosis grading in schistosomiasis. EBioMedicine, v. 37, p. 334-343, 2018.

CAI, P. Serum Exosomal miRNAs for Grading Hepatic Fibrosis Due to Schistosomiasis. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 10, p. 3560, 2020.

CHITSULO, L. *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. Acta tropica, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

CHOU, R; WASSON, N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. Annals of internal medicine, v. 158, n. 11, p. 807-820, 2013.

CHEN Q. *et al.* The role of microRNAs in the pathogenesis, grading and treatment of hepatic fibrosis in schistosomiasis. Parasites Vectors. v.12, n.611, 2019.

DERBALA, M.; *et al.* Aspartate transaminase to platelet ratio index in hepatitis C virus and Schistosomiasis coinfection. World journal of gastroenterology, v. 21, n. 46, p.13132, 2015.

DE SOUZA, Joelma R. *et al.* Treatment of human acute schistosomiasis with oxamniquine induces an increase in interferon-gamma response to *Schistosoma mansoni* antigens. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, p. 225-228, 2007.

EL-AHWANY, Eman *et al.* T regulatory cell responses to immunization with a soluble egg antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. The Korean Journal of Parasitology, v. 50, n. 1, p. 29, 2012.

ELMORSHEDY, H. *et al.* Elimination of schistosomiasis requires multifactorial diagnostics: evidence from high-and low-prevalence areas in the Nile Delta, Egypt. Infectious diseases of poverty, v. 9, p.1-13, 2020.

ENGELS, D. *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta tropica, v. 82, n. 2, p. 139-146, 2002.

GOES, A.M. *et al.* Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. III. In vitro granuloma modulation induced by immune complexes. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 44, n. 4, p. 434-443, 1991.



- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. Nature reviews immunology, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.
- GIRI, B.R. et al. Dynamic miRNA profile of host T cells during early hepatic stages of *Schistosoma japonicum* infection. Frontiers in Immunology, v.13, 2022.
- HAGHGOO, S. M.; SHARAFI, H.; ALAVIAN, S. M. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. v. 57, n. 5, p. 577-610, 2019.
- HE Y., HUANG C., ZHANG S.P., SUN X., LONG X.R., LI J. The potential of microRNAs in liver fibrosis. Cell Signal. Dec;24(12):2268-72, 2012.
- HIATT, R.A. et al. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. Journal of Infectious Diseases, v. 139, n. 6, p. 659-666, 1979.
- KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: Fiocruz, 2018.
- KANAI, R., Nakashima, A., Doi, S. et al. Interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. Sci Rep 11, 850, 2021.
- KELADA et al. miR-182 and miR-10a Are Key Regulators of Treg Specialisation and Stability during Schistosome and Leishmania-associated Inflammation. PLoS Pathog. 2013;9:e1003451.
- LIANG, Y. et al. Gene profile of chemokines on hepatic stellate cells of schistosome-infected mice and antifibrotic roles of CXCL9/10 on liver non-parenchymal cells. PlosOne, v.7, n. 8, e42490, 2012.
- LOVERDE PT, Osman A, Hinck A. *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. Exp Parasitol. v.3, p. 304-17, 2007.
- LAMBERTUCCI, J. R.; SANTOS S. L. C.; 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, v. 40, n. 5, 2007.
- LEITE, L. A. C. et al. Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and advanced periportal fibrosis. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 7, p. e2314, 2013.
- LEITE, L. A.C. et al. Splenectomy improves hemostatic and liver functions in hepatosplenic Schistosomiasis mansoni. PloS one, v. 10, n. 8, p. e0135370, 2015.
- LIN, Z. H. et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. Hepatology, v. 53, n. 3, p. 726-736, 2011.
- MORAIS, Clarice Neuenschwander Lins de et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 561-568, 2008.
- MANZELLA, A., et al. Schistosomiasis of the liver. Abdominal Imaging, New York, v.33, p.144-150, 2008.

- MENINGHER, T. *et al.* Schistosomal MicroRNAs isolated from extracellular vesicles in sera of infected patients: a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis. The Journal of Infectious Diseases, v. 215, n. 3, p. 378-386, 2017.
- OLIVEIRA, R. R. *et al.* Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 86, n. 2, p. 296, 2012.
- ONDIGO, Bartholomew N. *et al.* Functional studies of T regulatory lymphocytes in human schistosomiasis in Western Kenya. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 6, p. 1770, 2018.
- OMS. Institutional Repository for Information Sharing, Niamey. 2000. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66535>. Accessed: August 15, 2022
- OMS. Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. 2013. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. Acessado em: 15 de agosto de 2022
- OMS. Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control, Geneva, 2-4 December 1998. World Health Organization, 1999.
- OMS. Informal consultation on expanding schistosomiasis control in Africa: Geneva, Switzerland, 26 January 2010. World Health Organization, 2010.
- PEARCE, E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. The Journal of experimental medicine, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.
- 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, p. 163-7, 2008.
- PAZ, W.S. D. *et al.* Spatiotemporal clusters of schistosomiasis mortality and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil (1980-2017). Acta Trop, e32805215, 2020.
- PEARSON, J. C. *et al.* Modulating Hox gene functions during animal body patterning. Nat Rev Genet, v. 6, p. 893–904, 2005.
- RUDELL, Richard G. *et al.* Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB–regulated signaling in rat hepatic stellate cells. Hepatology, v. 49, n. 3, p. 887-900, 2009.
- RICHTER, J. *et al.* Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, p. 151-156, 2001.
- RICHTER, J. *et al.* Ultrasound in schistosomiasis: a practical guide to the standard use of ultrasonography for assessment of schistosomiasis-related morbidity: Second international workshop, October 22-26 1996, Niamey, Niger. World Health Organization, 2000.
- SILVEIRA-LEMOS, Denise *et al.* Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, p. 380-386, 2010.
- SHA L. *et al.* HOXB9 promotes epithelial-to-mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1 pathway in hepatocellular carcinoma cells. Clin. Exp. Med. v.15. p. 55–64, 2015.

SAMOIL, V. *et al.* Vesicle-based secretion in schistosomes: analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

SES. Secretaria Estadual de Saúde (PE). Plano integrado de ações para o enfrentamento às doenças negligenciadas no Estado de Pernambuco / SANAR 2015 – 2018. 2. ed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde; 2015. 46 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em:  
[http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/plano\\_sanar\\_2\\_edicao\\_29.08.17.pdf](http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/plano_sanar_2_edicao_29.08.17.pdf)

SILVA, JRM., NEVES, RH., e GOMES, DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84. ISBN 978-85-7541- 370-8

SONG, L. G. *et al.* History of schistosomiasis epidemiology, current status, and challenges in China: on the road to schistosomiasis elimination. Parasitology research, v. 115, n. 11, p. 4071-4081, 2016.

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

SUN, L.P. *et al.* Strategy of comprehensive control for schistosomiasis and its effect in key areas of Jiangsu Province. Chinese journal of schistosomiasis control [Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi] v. 23, n. 6, p. 626-633, 2011.

TAYLOR, Justin J.; MOHRS, Markus; PEARCE, Edward J. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Population. The Journal of Immunology, v. 176, n. 10, p. 5839-5847, 2006.

TAKAHASHI, Kenji *et al.* microRNAs in liver disease: from diagnostics to therapeutics. Clinical biochemistry, v. 46, n. 10-11, p. 946-952, 2013.

THOMAS CM, Timson DJ. The Mechanism of Action of Praziquantel: Can New Drugs Exploit Similar Mechanisms? Curr Med Chem. 2020;27(5):676-696. doi: 10.2174/0929867325666180926145537. PMID: 30259811.

ULLOA, L.; DOODY, J.; Massagué, J. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signalling by the interferon- $\gamma$ /STAT pathway. Nature, v. 397, p.710–713, 1999.

UTZINGER J *et al.*, Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. Antimicrob Agents Chemother. 2003 May;47(5):1487-95. doi: 10.1128/AAC.47.5.1487-1495.2003. PMID: 12709312; PMCID: PMC153321.

WATANABE, K. *et al.* Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. Parasite immunology, v. 31, n. 8, p. 440-446, 2009.

WANG, X. Y. *et al.* Estimating the prevalence of schistosomiasis japonica in China: a serological approach. Infectious diseases of poverty, v.7, n.1, p.1-10, 2018.

WEBER, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clinical chemistry, v. 56, n.11, p.1733-1741, 2010.

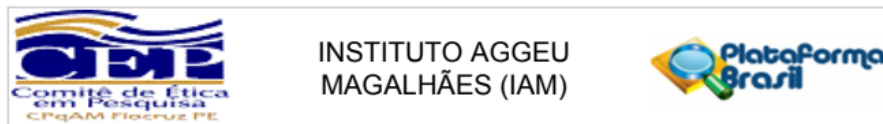
ZHENG, B. *et al.* T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. Frontiers in immunology, v.11, p.61, 2020.

ZHU Z, ZHANG X, WANG G, ZHENG H. Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. Hepat Mon. v.14, n.8, e18672, 2014.

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

ZHENG, B. *et al.* T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. Frontiers in immunology, v. 11, p. 61, 2020.

## ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos níveis de expressão de smallRNAs em pacientes infectados por *Schistosoma mansoni*.

**Pesquisador:** LUYDSON RICHARDSON SILVA VASCONCELOS

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 38302320.8.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

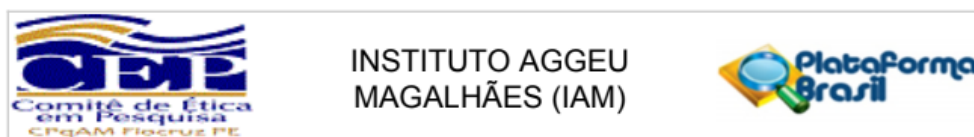
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.451.421

#### Apresentação do Projeto:

As informações dos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas do documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1511534.pdf de 21.09.2020, cujo preenchimento foi realizado pelo pesquisador responsável.

O projeto busca descrever os principais microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes infectados por *Schistosoma mansoni* e indivíduos controle, sem infecção, buscando entender os mecanismos



Continuação do Parecer: 4.451.421

posteriormente extração de RNA através do kit RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen). Essas abordagens foram realizadas em pesquisa anteriormente aprovada. A confirmação dos microRNAs significativos será realizada com experimentos de Qpcr das amostras por tecnologia Taqman (life technologies) através de ensaios pré-desenhados. Dessa forma, espera-se encontrar uma correlação positiva ou negativa de microRNAs sequenciados com o comprometimento hepático, no agravamento da doença.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Descrever os principais smallRNAs (microRNAs) diferencialmente expressos entre pacientes infectados por *Schistosoma mansoni* nas diferentes formas clínicas.

Objetivos secundários:

- Caracterizar a população estudada, quanto às características clínico epidemiológicas;
- Verificar a existência de diferenças na expressão de microRNAs entre indivíduos com a infecção por *Schistosoma mansoni* e indivíduos controle em amostras de sangue;
- Investigar as principais vias reguladas pelos microRNAs diferencialmente expressos nos indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni*;

- Investigar as principais vias reguladas pelos microRNAs diferencialmente expressos nos indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni*;
- Verificar a existência assinaturas moleculares relacionadas com a gravidade da doença hepática em indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: desconforto e/ou constrangimento em permitir uso das informações e amostras armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Referência em Esquistossomose da Fiocruz-PE.

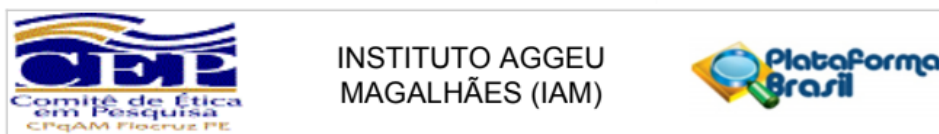
Benefícios: Desenvolvimento de estudos para melhoria no diagnóstico, tratamento, e manejo clínico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um pesquisa que visa descrever os principais smallRNAs (microRNAs) diferencialmente expressos entre pacientes infectados por *Schistosoma mansoni* nas diferentes formas clínicas. Para isso, utilizará amostras de sangue de biorrepositório do serviço de referência de Esquistossomose obtidas em inquérito epidemiológico no município de Porto de Galinhas através do projeto "Imunodiagnóstico para Esquistossomose: Seleção de Novos Antígenos e Desenvolvimento de Kit para aplicação em Áreas de Baixa Endemicidade".

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

Página 02 de 05



Continuação do Parecer: 4.451.421

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos entregues sem pendências.

**Recomendações:**

Entregas de relatórios parciais e final devem ser feitas via notificação. Os relatórios parciais devem ser apresentados, pelo menos, semestralmente. Qualquer alteração no protocolo no decorrer da pesquisa, como também mudança de equipe, devem ser informados via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências do parecer n.4.334.288 foram atendidas, estando o protocolo sem óbice ético.

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais

PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1511534.pdf	13/11/2020 14:03:40		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	12/11/2020 18:50:41	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_Apoio_Financeiro.pdf	12/11/2020 18:46:06	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito

**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

Página 03 de 05



**INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)**



Continuação do Parecer: 4.451.421

Outros	Declaracao_de_Compromisso.pdf	21/09/2020 12:58:50	VASCONCELOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_autorizacao_biorrepositorio.pdf	21/09/2020 12:55:29	LUYDSON RICHARDSON SILVA VASCONCELOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/09/2020 12:51:20	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 09 de Dezembro de 2020

**Assinado por:**  
**Maria Almerice Lopes da Silva**  
**(Coordenador(a))**

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “**Avaliação dos níveis de expressão de smallRNAs em pacientes infectados por *Schistosoma mansoni***”, sob a responsabilidade do pesquisador: Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos.

Se decidir participar dela, por favor leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o senhor (a) não consiga entender, converse com a pesquisador(a) responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los. A proposta deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é explicar o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Essa pesquisa pretende identificar possíveis características genéticas estudando o sangue de pessoas com esquistossomose e sem a infecção. Com esse estudo, acreditamos contribuir para o aprimoramento de diagnósticos que forneçam resultados a respeito da gravidade da doença e comprometimento do fígado, assim como fornece fundamentos para o desenvolvimento de remédios que possam retardar a evolução da fibrose no fígado.

Essa é uma atividade voluntária, sendo possível desistir a qualquer momento e a participação não envolve remuneração. O participante poderá se recusar e/ou retirar este consentimento a qualquer momento que desejar, sem prejuízo a ambas as partes.

A sua contribuição na pesquisa será por meio da sua permissão para uso de suas amostras sanguíneas, armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Referência em Esquistossomose da Fiocruz-PE. A coleta de suas amostras foi realizada através do projeto “Imunodiagnóstico para Esquistossomose: Seleção de Novos Antígenos e Desenvolvimento de Kit para aplicação em Áreas de Baixa Endemicidade”, onde o (a) Sr. (a) participou voluntariamente, permitindo o armazenamento dela. O risco da sua participação é o desconforto ou constrangimento em permitir uso das amostras e suas informações. No entanto, garantimos que todos os nossos esforços estarão direcionados para que situações de constrangimento não ocorram. Inclusive, garantimos que sua identidade não venha a público sob hipótese alguma.

Todas as informações colhidas serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

**Rubrica pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Rubrica**

**participante:** \_\_\_\_\_



APÊNDICE B – **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Menor de Idade)**

Convidamos o (a) Sr (a) a permitir que o menor sob sua guarda participe da pesquisa “**Avaliação dos níveis de expressão de smallRNAs em pacientes infectados por *Schistosoma mansoni***”, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos, pretendendo diagnosticar e tratar crianças e jovens menores de 18 anos, que tenham vermes intestinais e estudar os componentes do sangue dessas crianças e jovens para classificar a gravidade da doença.

A participação do menor sob sua guarda é voluntária e se dará por meio da sua permissão para uso das amostras sanguíneas dele, armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Referência em Esquistossomose da Fiocruz-PE. A coleta das amostras foi realizada através do projeto “Imunodiagnóstico para Esquistossomose: Seleção de Novos Antígenos e Desenvolvimento de Kit para aplicação em Áreas de Baixa Endemicidade”, onde o (a) Sr. (a) autorizou o armazenamento delas. O risco da participação é o desconforto ou constrangimento em permitir uso das amostras e informações obtidas. No entanto, garantimos que todos os nossos esforços estarão direcionados para que situações de constrangimento não ocorram.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos os que participarem da pesquisa. Se o (a) Sr (a) permitir a participação do menor, estará contribuindo para o melhor entendimento da doença e melhorias no diagnóstico e escolha do tratamento utilizado pelos pacientes parasitado por vermes.

Se depois de consentir a participação do menor sob sua guarda o Sr (a) e quiser desistir da participação do mesmo, tem o direito e a liberdade de retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa ou ao acompanhamento médico da criança. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Caso haja gastos devido a participação na pesquisa o (a) Sr (a) será ressarcido. Deixamos expresso que o (a) Sr (a) tem o total direito à indenização por via legal caso haja danos ou prejuízos decorrentes da participação nessa pesquisa.

**Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade da criança não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, pelo telefone (81) 2101-2661/ 2671, e poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/IAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639 para dúvidas sobre a aprovação da pesquisa ou reclamações/denúncias.**

**Rubrica pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Rubrica participante:** \_\_\_\_\_

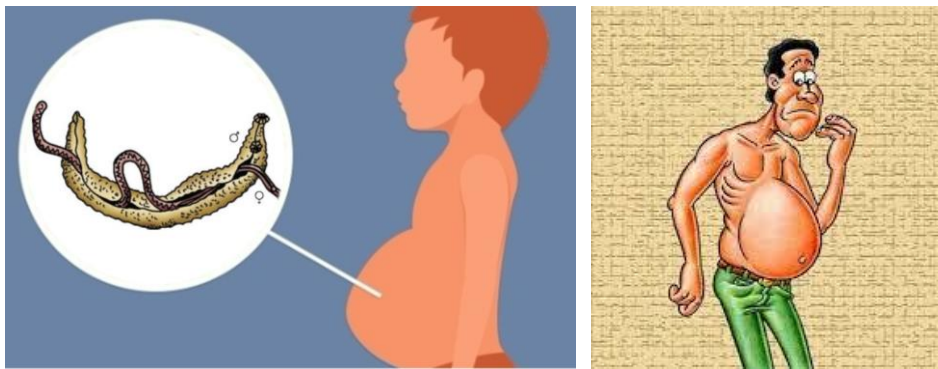
## APENDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Menor de Idade maior ou igual a 7 anos)

Olá! Convidamos você a participar da pesquisa: “**Avaliação dos níveis de expressão de smallRNAs em pacientes infectados por *Schistosoma mansoni***”, sob a coordenação do pesquisador: Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos, desenvolvida no Instituto Aggeu Magalhães. Se você não entender alguma palavra deste texto, pode perguntar ao pesquisador deste estudo, ou com algum membro da equipe.

#### Sobre essa pesquisa

O objetivo dela é estudar estratégias para ajudar as pessoas com esquistossomose, incluindo as crianças. Essa doença é causada por um verme que se aloja na barriguinha e causa muita dor e febre. Com esses estudos, queremos descobrir se existe algo que nos ajude a tratar melhor os problemas dessa doença, fazendo com que você e outras pessoas não sofram mais com ela.



#### Como você pode ajudar?

Uma pequena amostra de sangue do seu corpo foi coletada quando você fez os exames para descobrir se você estava com essa doença, num estudo anterior. Podemos descobrir uma forma das pessoas melhorarem da esquistossomose com essa amostra, se você nos permitir, e você não vai precisar coletar de novo. Essa é uma atividade voluntária, isto significa que você não é obrigado (a) a participar dela, e pode desistir a qualquer momento.

#### Existe algum risco em participar da pesquisa?

Talvez você se sinta um pouco envergonhado (a) em permitir que usemos a amostra de sangue que foi coletada, ou o uso das suas informações, mas faremos de tudo para garantir que você não fique com vergonha e nenhuma outra pessoa fora da pesquisa ficará sabendo seu nome, ou suas informações, vamos guardar tudo em segredo, e só iremos publicar os resultados do estudo, mas sem colocar suas informações.

**Rubrica Pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Rubrica**

**Participante:** \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL

Artigo submetido na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (ISSN 1678-8060):  
Em outubro de 2022.

**Analysis of miR-10a and *IFNG* expression before and after treatment for chronic schistosomiasis mansoni**

Débora Nascimento da Nóbrega<sup>1\*</sup>, Ana Virgínia Matos Sá Barreto<sup>2</sup>, Roberta Santos de Souza<sup>1</sup>, Kleyton Palmeira do Ó<sup>1</sup>, Raul Emídio de Lima<sup>1</sup>, Ana Lúcia Coutinho Domingues<sup>3</sup>, Edmundo Pessoa Lopes<sup>3</sup>, Clarice Neuenschwander Lins de Moraes<sup>1</sup>, Elaine Christine de Souza Gomes<sup>1</sup>, Luydson Richardson Silva Vasconcelos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Aggeu Magalhães (IAM/ Fiocruz), Recife-PE. \*E-mail: deborannobrega@uis.pe.senac.br

<sup>2</sup> Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU), Recife -PE.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Recife, PE, Brazil

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the expression of miR-10a and *IFNG* as biomarkers of inflammation and to investigate the correlation between them and Praziquantel treatment. **Methods:** We evaluated 45 samples stored in the biorepository, 30 belonged to the group of individuals with a positive diagnosis for *S. mansoni* and 15 belonged to the group of individuals without infection (controls). For the prediction of target genes for miR-10a in TargetScan v.8.0, enrichment was performed using the DAVID online database for Functional Annotation of Biological Processes, Molecular Function and Metabolic Pathways. Expression assay of miR-10a and *IFNG* used the approach the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Results:** The enrichment showed 3459 target genes that act in the Signaling Pathways Regulating, Transcription Regulation, Translation Regulation and RNA-mediated gene silencing. However, miR-10a expression levels did not show statistical differences before and after treatment. In contrast, *IFNG* was significantly higher in individuals before Praziquantel treatment than after 90 days. **Conclusion:** Despite acting in the regulation of target genes with regulatory activity, miR-10a did not present evidence as a biomarker of inflammation in the therapeutic follow-up in schistosomiasis. However, the levels of *IFNG* expression were significantly higher before treatment.

**Keywords:** Schistosomiasis, Interferon-gamma, MicroRNA, Praziquantel, Gene expression regulation.

## INTRODUCTION

In 1948 the World Health Organization (WHO) recognized the relevance of Schistosomiasis for Public Health, and in 1980 Bayer and Merck laboratories developed praziquantel. Subsequently WHO recommended large-scale treatment with praziquantel in populations at risk of infection, along with other complementary prevention measures [1].

However, this treatment plan was not effective in many endemic areas with difficulty in providing clean water, sanitation and education. As a result of this, schistosomiasis soon began to assume new transmission scenarios in urban locations, raising indirect costs such as sickness and premature death [1].

Data from the Ministry of Health indicates the Northeast region (NE) of Brazil as responsible for the highest record of schistosomiasis cases, and places Pernambuco (PE) among the states with the highest mean prevalence of people infected with *Schistosoma mansoni* [2]. Therefore, the majority of deaths related to schistosomiasis in Brazil were reported in the Northeast region, from 1980 to 2017, and 50.7% of deaths occurred in PE [3].

Experimental epigenetic studies *in vivo* and *in vitro*, related to post-transcriptional regulation by microRNAs (miR) in schistosomiasis reveal potential markers to prognosis, and contribute to the knowledge of gene pathways and proteins associated punctually with the clinical condition of patients, favoring the identification of therapeutic targets in schistosomiasis liver disease [4].

The miR-10 family is known to regulate HOX genes, participants in cell proliferation, in accordance with this miR-10a was associated with multiform types of cancers, and in resistance to drugs used in cancer treatment [5]. In addition, Cabantous *et al.* [6] revealed that miR-10a was significantly *upregulated* in individuals with hepatic fibrosis caused by *S.*

*mansoni*. This association of miR-10a with fibrosis is related to its involvement in the TGF- $\beta$  pathway, targeting the *tgfb* gene, increasing its expression [7].

In contrast, IFN- $\gamma$  is a TGF- $\beta$  antagonist and an increase in *IFNG* expression were found in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of *S. mansoni* infected patients when stimulated with soluble egg antigens (SEA) , when compared with PBMCs of individuals previously infected and stimulated in the same way [8].

Therefore, the purpose of this study was to evaluate the expression of miR-10a and *IFNG* before and after Praziquantel treatment of schistosomiasis and to investigate a correlation with hepatic fibrosis and parasitic load of individuals during *S. mansoni* infection.

## **METHODS**

### **Study Population**

The samples were obtained from the population survey conducted in Porto de Galinhas (n=45), in the state of Pernambuco (Brazil), by the Reference Service in Schistosomiasis from Instituto Aggeu Magalhães (IAM – Fiocruz). The 45 samples were stored in the biorepository, 30 belonged to the group of individuals with a positive diagnosis for *S. mansoni* through Kato-katz and 15 belonged to the group of individuals without infection (controls). Individuals who presented stool samples positive for *S. mansoni* received praziquantel treatment and samples were collected before and after 90 days of treatment. The parasitic load was measured by the egg count on the Microscope Slides and multiplied by constant 24, obtaining the number of eggs per gram of feces (epg). Liver measurements were obtained by abdominal ultrasound scan, and the Niamey method was used to classify liver fibrosis [9].

### **Gene prediction and functional enrichment**

The prediction of target genes for human miR10a-3p was performed by the TargetScanHuman v.8.0 ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) database. All genes found were copied to the DAVID enrichment platform (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), and data from KEGG Signaling Pathways and Functional Annotations were chosen by UNIPROT. Only information with a significance filter with  $p < 0.05$  was considered and the benjamini-hochberg test was applied. The graphs were performed by applying the data in the GraphPad Prism Software version 5 statistics program.

### **RNA Extraction, cDNA Synthesis and Expression Assay**

PBMCs were isolated using the Ficoll Paque gradient method. Total RNA extraction in these isolated cells was performed with Trizol (Invitrogen). After purification of total RNA, cDNA was prepared with 10 ng of total RNA using TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit. The differential expression of miR-10a was evaluated in individuals with schistosomiasis and controls, using Taqman MicroRNA Assay, following instructions manufactured in QuantStudio 5™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The data were normalized using  $\beta$ -actin as endogenous control. The relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### **Biochemical markers dosage of liver damage**

Serum samples were measured with the support of Hospital das Clínicas' Laboratory (Pernambuco - Brazil), for The following biochemical markers of liver damage: Ferritin, Direct Bilirubin (DB) and Total Bilirubin, Alkaline Phosphatase (ALP), Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), and Gamma Glutamyl Transferase (GGT).

### **Statistical Analyses**

For the relative expression data of miR-10a, the calculation of  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  was used for relative quantification of the expression that can have modified values depending on the group chosen as reference for analysis. First, the group “Before Treatment” was used as a reference, subsequently, the control group (Individuals negative for *S. mansoni*) served as a reference for the other groups.

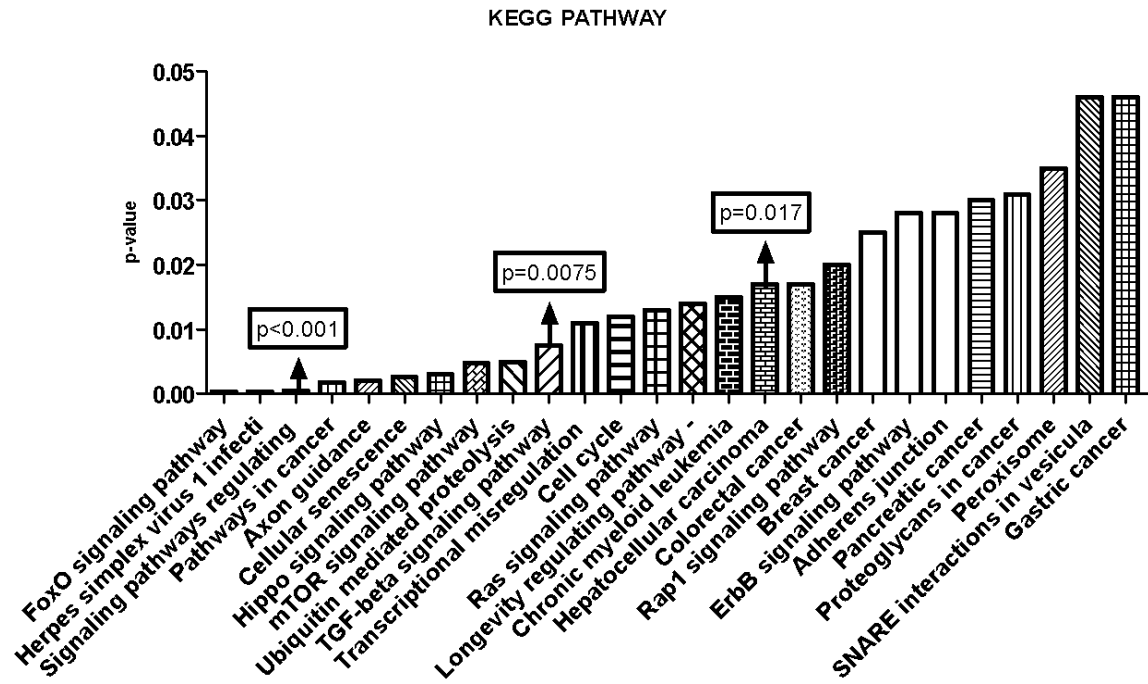
Shapiro-Wilk test was used for variable distribution analysis. In the paired samples to compare the groups “Before Treatment” and “After Treatment”, the Wilcoxon matched pairs signed rank test (two-tailed) was used. For the control group Unpaired T test was used. These analyses were performed using GraphPad Prism Software version 5. For bivariate correlation analysis, the IBM SPSS Statistics v. 28.0.1.1 and the Spearman Correlation Coefficient (two-tailed) were used.

### **Ethical Considerations**

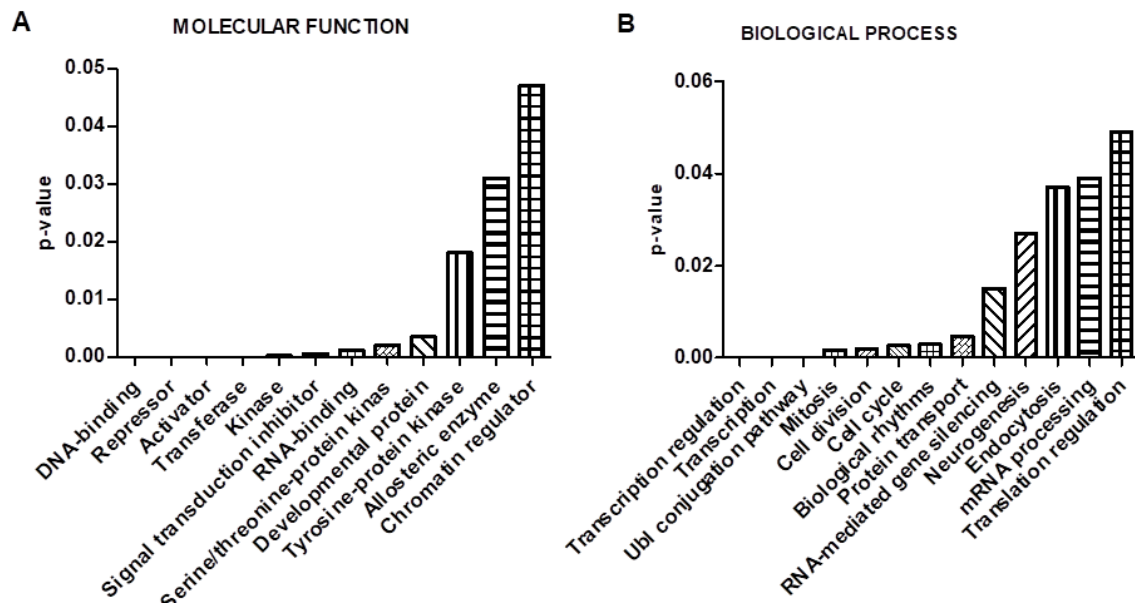
This project was approved by the Research Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (CEP/IAM), as provided for in resolution 466/12 of the National Health Council (CNS). Patients or family members were informed and signed the Informed Consent Form and the Free and Informed Consent Form for people over seven years and under 18 years of age. CAAE: 38302320.8.0000.5190.

### **RESULTS**

A total of 3,459 target genes of miR-10a were found using TargetScan v. 8.0. Enrichment of molecular pathways found 26 pathways significantly associated with miR-10a target genes. Among these pathways, we highlight the signaling pathway of beta TGF ( $p=0.0075$ ), involved in the differentiation of hepatic stellate cells and fibrogenesis, also found pathways related to Cancer ( $p=0.0018$ ), Hepatocellular Carcinoma ( $p=0.017$ ) and Signaling Pathway Regulation ( $p<0.001$ ) (Figure 1).

**Figure 1-** Pathway Annotation (KEGG) from the enrichment of target genes of miR-10a

Molecular functions are largely related to the regulation of gene expression such as DNA binding, RNA binding, Activation and Repression. Likewise, significantly associated biological processes involve Transcriptional Regulation, Transduction Regulation, RNA-mediated Gene Silencing, and processes involved in Cell Division (Figure 2).

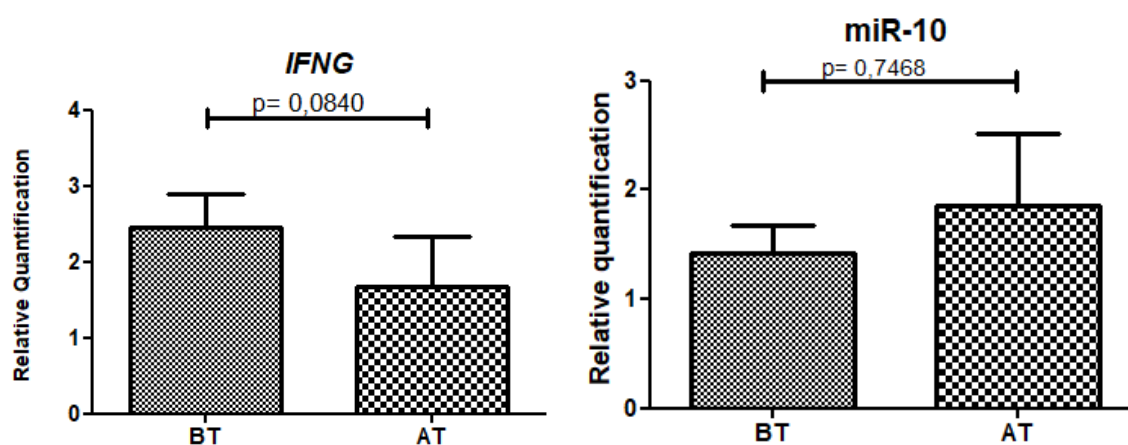
**Figure 2-** Functional Annotation (UNIPROT) from the enrichment of target genes of miR-10a



The study population comprised 30 individuals living in Porto de Galinhas and 11 of Escada, both municipalities endemic to schistosomiasis. Most individuals (56.1%) were male with a median age of 31 years. 29.2% had previous schistosome infection and 34.1% were treated with praziquantel in the past, regardless of previous infection. 21.9% had alcohol consumption and had steatosis. Regarding fibrosis, most (80%) had C, D and DC degrees (Table 1).

The relative expression of *IFNG* before Praziquantel treatment was higher than after 90 days, but there was no significant difference ( $p=0.2741$ ). The relative expression of miR-10a after treatment was higher, however this difference was also not statistically significant (Figure 3).

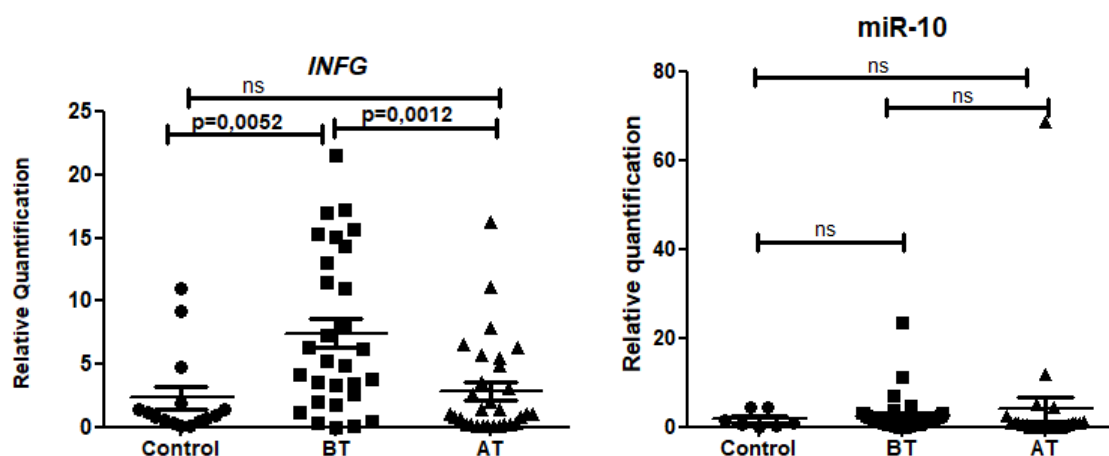
**Figure 3** - Relative quantification ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of the expression of *IFNG* and miR-10a



Note: Wilcoxon Test. BT= Before treatment; AT=After treatment

The calculation  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  was performed assuming the relative expression of non-infected individuals ( $n=15$ ) as a reference. The *IFNG* values before Praziquantel therapy were significantly higher than after treatment in this calculation ( $p=0.005$ ) (Figure 4).

**Figure 4** - Relative quantification ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of the expression of *IFNG* and miR-10a before and after treatment with reference of the expression of control samples



Note: Unpaired t test. ns = non significant; BT= Before treatment; AT=After treatment

There was no correlation between miR-10a and parasitic load, treatment and hepatic fibrosis, but these variables were significantly correlated with *IFNG*, presenting a positive correlation (Table 2). However the Spearman coefficient value indicates that this correlation is weak ( $R=0.482$ ).

## DISCUSSION

The regulation of pathogenesis in schistosomiasis depends mainly on the balance in the immune response by TCD4+ cells classified as T helper (Th) 1 and Th2. The immune response in the acute phase is primarily mediated by th1 pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 and IL-6) while in the chronic phase, little IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are produced, as these are negatively regulated by the Th2 response (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13) [10]. However, blood samples from patients with hepatic-splenic and hepatic-intestinal fibrosis after being stimulated in RPMI medium with SEA and after IL-13 neutralization showed significantly higher levels of IFN- $\gamma$  compared to acute patients [11]. In this study, it was seen that IFN- $\gamma$  levels are significantly higher in chronic patients prior to treatment with praziquantel than 90 days after treatment, but there was no correlation between IFN- $\gamma$  and grade of liver fibrosis,

this can be attributed to the small number of samples when the comparison groups were distributed.

Still, we can assume from previous studies that the permanence of IFN- $\gamma$  in the chronic phase before treatment may be related to the presence of SEA and adult worm antigens (SWAR), but is not related to the presence of fibrosis in the liver.

Cellular and humoral response analyzes of individuals in endemic areas in Bahia and Minas Gerais (Brazil), who were not infected with *S. mansoni*, demonstrated that high levels of IFN- $\gamma$  are secreted by PBMC after stimulation of SEA and SWAR, *in vitro*, when compared to PBMCs from infected individuals from the same areas. Suggesting that the presence of IFN- $\gamma$  may contribute to resistance to infection [8, 12]

Studies show that IFN- $\gamma$  is capable of preventing the progression of fibrosis by stimulating mesenchymal stem cells (MSCs) that prevents fibroblast activation and extracellular matrix expansion [13]. IFN- $\gamma$  is also capable of inhibiting TGF- $\beta$  signaling, through phosphorylation and activation of the Transcription factor Stat1, which in turn induces the expression of SMAD7 responsible for inhibiting the TGF- $\beta$  pathway [13, 14].

In our results we did not see a correlation between miR-10a and fibrosis, but in the literature, associations of this microRNA in the development of fibrosis were found, being contrary to the role of IFN- $\gamma$ . An experimental study using hepatic fibroblasts from 20 mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis showed that miR-10a is highly expressed in this group when compared to the expression of 20 liver tissue samples from controls ( $-7.84 \pm 1.38$  vs.  $-9.97 \pm 1.59$ ,  $P < 0.05$ ). In addition, the authors revealed that miR-10a is capable of increasing fibroblast proliferation. When fibroblasts were transferred to culture with the addition of mimetized miR-10a, the concentration of TGF $\beta$ 1 increased significantly, while the expression of SMAD7 (TGF- $\beta$  inhibitor) decreased [7].

Similarly, in another study with intestinal mucosa culture of patients with Crohn's Disease (Inflammatory Intestine Disease) TGF- $\beta$  was able to increase the expression of miR-10a while IFN- $\gamma$  and TNF had antagonistic effects, inhibiting the expression of miR-10a [15].

Cabantous *et al.* [6] performed RNAseq with 22 samples of liver biopsy from individuals infected with *Schistosoma japonicum* (in China), presenting mild or absent peripheral fibrosis, and central fibrosis in the left lobe of mild to moderate thickness, and found significantly *upregulated* miR-10a in patients with fibrosis compared to control liver samples (donors in France).

Unlike the study conducted by Cabantous *et al.* [6] our study is the first to investigate the expression of miR-10a in PBMCs of patients with schistosomiasis mansoni and compare with the times before and after Praziquantel administration. A previous study investigated the expression profile in T cells isolated from PBMCs and liver tissue of mice infected with *S. japonicum*. According to the authors, miRNA-10a is co-detected in T cells originating from PBMCs and the liver, but has different expressions, being more expressed in the liver [16].

We suggest that more advanced longitudinal studies be conducted in patients with schistosomiasis, with longer follow-up after praziquantel therapy in endemic areas, and that other miRNAs be investigated as biomarkers, in addition to immunological markers such as IFN- $\gamma$  for better follow-up of the clinical pathology of these patients.

## CONCLUSION

miR-10a acts in the regulation of target genes with regulatory activity associated with cancer and TGF- $\beta$  signaling, but did not present significant differences in PBMCs of patients with chronic schistosomiasis after Praziquantel therapy, however *IFNG* expression levels

decreased significantly. We suggest that further studies should be conducted evaluating the expression of miR-10a in liver tissue in individuals with liver fibrosis and the expression of *IFNG* should be investigated in individuals with a history of reinfections by *S. mansoni*.

## FUNDING

This study was funded in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001. And also funded by the Foundation for Support to Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) - Funding code: IBPG-1686-2.02/19.

## REFERENCES

- [1] World Health Organization. Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. 2013. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. Accessed: 15 August 2022
- [2] Brazil. Ministry of Health. Integrated plan of strategic actions to eliminate leprosy, filariasis, schistosomes and oncocercosis as a public health problem, trachea as a cause of blindness and control of geohelminthiases: action plan 2011-2015. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_hanseniose.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseniose.pdf). Accessed: August 15, 2022.
- [3] Paz WSD, Gomes DS, Ramos RES, Cirilo TM, Santos IGA, Ribeiro CJN, et al. Spatiotemporal clusters of schistosomiasis mortality and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil (1980-2017). *Acta Trop*, 2020; doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105668.
- [4] Chen Q, Zhang J, Zheng T, Chen H, Nie H, Zheng B, Gong QL. The role of microRNAs in the pathogenesis, grading and treatment of hepatic fibrosis in schistosomiasis. *Parasit Vectors*, 2019;12:611.
- [5] Pearson JC, Lemos D, Mc Ginnis Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*, 2005; (6):893–904.
- [6] Cabantous S, Hou X, Louis L, He H, Mariani O, Sastre X, Daujat-Chavanieu M, Li Y, Dessein A. Evidence for an important role of host microRNAs in regulating hepatic fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. *Int. Journal for Parasitol.*, 2017; 47(13):823-830.
- [7] Zhou G, Lin W, Fang P, Lin X, Zhuge L, Hu Z, Jin L. MiR-10a improves hepatic fibrosis by regulating the TGFβ1/Smads signal transduction pathway. *Exp Ther Med*. 2016;12(3):1719- 1722.

[8] Oliveira RR, Figueiredo JP, Cardoso LS, Jabar RL, Souza RP, Wells MT, et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(2):296.

[9] World Health Organization. Institutional Repository for Information Sharing, Niamey. 2000. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66535>. Accessed: August 15, 2022

[10] Zheng B, Zhang J, Chen H, Nie H, Miller H, Gong Q, Liu C. T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. *Front immunol.* 2020;11:61.

[11] Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Domingues ALC, et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:561-568.

[12] Correa-Oliveira R, Caldas I, Martins-Filho A, Queiroz C, Lambertucci J, Cunha-Melo J, et al. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop.* 2000;77: 141-146.

[13] Kanai R, Nakashima A, Doi S, Kimura T, Yoshida K, Maeda S, et al. Interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. *Sci Rep.* 2021; 11: 850.

[14] Ulloa L, Doody J, Massagué J. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signalling by the interferon- $\gamma$ /STAT pathway. *Nature.* 1999;397:710–713.

[15] Wu W, He C, Liu C, Cao AT, Xue X, Evans-Marin HL, et al. miR-10a inhibits dendritic cell activation and Th1/Th17 cell immune responses in IBD. *Gut.* 2015;4(11):1755-1764.

[16] Giri BR, Li S, Fang C, Qiu L, Yan S, Pakharukova MY, & Cheng G. Dynamic miRNA profile of host T cells during early hepatic stages of *Schistosoma japonicum* infection. *Frontiers in Immunology.* 2022; 2;(13):911139. Doi: 10.3389/fimmu.2022.911139

**Table 1** - Clinical and epidemiological characteristics of the patients in the study

Clinical characteristics	Individuals positive for <i>S. mansoni</i> N=41	Individuals negative for <i>S. mansoni</i> N=15
Age [Years (minimum-maximum)]	31 (9-69)	32 (12-58)
Gender		
Male [n(%)]	23 (56.1%)	8 (53.4%)

Female [n(%)]	18 (43.9%)	7 (46.7%)
Previous infection [n(%)]	12 (29.2%)	5 (33.4%)
Previous treatment [n(%)]	14 (34.1%)	11 (73.4%)
Alcohol consumption [n(%)]	9 (21.9%)	4 (26.7%)
Parasitic load [epg (minimum-maximum)]	24 (1-1572)	0
Degrees of Fibrosis		
A-B [n(%)]	6 (14.6%)	9 (60%)
C-D/DC [n(%)]	33 (80.5%)	6 (40%)
E [n(%)]	2 (4.9%)	0
Steatosis [n(%)]	9 (21.9%)	2 (13.4%)
Portal Vein [D(St)]	0.91 (CI95%: 0.86-0.96)	0.88 (CI95%: 0.81-0.94)

A-B= Without fibrosis; C = Peripheral fibrosis; D = Central fibrosis; DC = Central and Peripheral fibrosis; E = Hyperechoic patches expanding from the portal vessels into the parenchyma.

**Table 2 Correlation test between IFN- $\gamma$  and miR-10a**

Variables	<i>IFNG</i>		miR-10a	
	R	p	R	p
Parasitic load	0,079	0,622	0,235	0,138
Liver fibrosis	0,020	0,904	-0,151	0,354
Treatment	-0,228	<b>0,043</b>	-0,210	0,091
IFN- $\gamma$	1	-	0,482	<b>0,001</b>

Spearman test

**Table 2** Correlation between biochemical parameters and *IFNG*/miR-10a in individuals with schistosomiasis before treatment (n=30).

Biochemical parameters	<i>IFNG</i>	miR-10a
------------------------	-------------	---------

	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
ALP (U/L)	-0,0819	0,6972	0,1291	0,5384
GGT (mg/dL)	-0,0894	0,6707	-0,1042	0,6203
TGO (U/L)	-0,2333	0,2616	0,1310	0,5326
TGP (U/L)	-0,2180	0,2952	-0,1806	0,3877
Ferritin (ng/dL)	<b>0,7210</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	-0,05283	0,8020
BT (mg/dL)	-0,1602	0,4444	0,3166	0,1232
BD (mg/dL)	-0,0970	0,6446	0,1163	0,5800

Pearson test (two-tailed)

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1-** Pathway Annotation (KEGG) from the enrichment of target genes of miR-10a.

**Figure 2-** Functional Annotation (UNIPROT) from the enrichment of target genes of miR-10a

**Figure 3 -** Relative quantification ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of the expression of *IFNG* and miR-10a. Note: Wilcoxon Test. BT= Before treatment; AT=After treatment

**Figure 4 -** Relative quantification ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of the expression of *IFNG* and miR-10a before and after treatment with reference of the expression of control samples. Note: Unpaired t test. ns = non significant; BT= Before treatment; AT=After treatment



## APÊNDICE E – ARTIGO DE REVISÃO

Artigo aceito na revista Expert Review of Molecular Diagnostics. Fator de Impacto: 5.225. <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2182190>

Expert Review of Molecular Diagnostics



### MicroRNA dysregulation in schistosomiasis-induced hepatic fibrosis: a systematic review

Journal:	<i>Expert Review of Molecular Diagnostics</i>
Manuscript ID	ERO-2022-ST-0173
Manuscript Type:	Systematic Review
Keywords:	MicroRNAs, Schistosomiasis, Hepatic fibrosis, Biomarker, Epigenetics, Prognosis, Transcriptional Regulator, Bilharziasis, Katayama fever, miRNA

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## MicroRNA dysregulation in schistosomiasis-induced hepatic fibrosis: a systematic review

**Authors:** Débora Nascimento da Nóbrega<sup>a,\*</sup>, Tatiana Lins Carvalho<sup>b</sup>, Kleyton Palmeira do Ó<sup>a</sup>, Raul Emídio de Lima<sup>a</sup>, Isabela Cristina Cordeiro Farias<sup>c</sup>, Roberta dos Santos Souza<sup>a</sup>, Julia Braga Pereira<sup>a</sup>, Augusto César Nascimento Maranhão<sup>c</sup>, Victor Fernando da Silva Lima<sup>c</sup>, Ana Luíza Trajano Mangueira de Melo<sup>d</sup>, Thaysa Carolina Gonçalves Silva<sup>e</sup>, Taciana Furtado de Mendonça Belmont<sup>c</sup>, Elaine Christine de Souza Gomes<sup>a</sup>, Luydson Richardson Silva Vasconcelos<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil.

<sup>b</sup> Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>e</sup> Laboratório Adolfo Lutz, Recife, PE, Brazil.

### Abstract

**Background:** MicroRNAs act in gene regulation in several common liver diseases and may play an essential role in activating hepatic stellate cells. The role of these post-transcriptional regulators in schistosomiasis needs to be further studied in populations from endemic areas for a better understanding of the disease, the development of new therapeutic approaches, and the use of biomarkers for the prognosis of schistosomiasis. **Areas covered:** we performed a systematic review to describe the main human microRNAs identified in non-experimental studies associated with aggravation of the disease in people infected with *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) and *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*). Structured searches were carried out in Pubmed, Medline, Science Direct, Directory of Open Access Journals, Scielo, Medcarib, and Global Index Medicus databases without time and language restrictions. This is a systematic review following the guidelines of the PRISMA platform. **Expert Opinion:** The miRNAs miR-146-5p, -150-5p, let-7a-5p, let-7d-5p, -92a- 3p, -532-5p are associated with liver fibrosis in schistosomiasis caused by *S. japonicum*, revealing that these miRNAs that have been shown to be associated with liver fibrosis are good targets for new studies that evaluate their potential as a biomarker or even treating liver fibrosis in schistosomiasis.

**Keywords:** Bilharziasis; Biomarker; Hepatic fibrosis; Katayama fever; MicroRNAs; miRNA; Schistosomiasis.

### Highlights

- The expression levels of miR-146a-5p, -150-5p, let-7a-5p, let-7d-5p, -532-5p in serum and exosomes were significantly lower in patients with fibrosis than in those without fibrosis.
- Although the expression levels of microRNA 150-5p were upregulated in liver tissue, the microRNA 150-5p was significantly lower in serum and exosomes in patients infected with *S. japonicum*, but the mechanisms responsible for this difference have not been elucidated.
- The expression level of miR-92a- 3p in the exosome was positively correlated when comparing patients with fibrosis to those without fibrosis.
- No studies on infection by *S. mansoni* were found in this review comparing human microRNAs in liver disease.

## 1. Introduction

Schistosomiasis is considered to be a neglected disease. It affects more than 230 million people worldwide and is one of the most important parasitic diseases in terms of morbidity and mortality [1]. Most people affected have low incomes and live in places where sanitation and hygiene conditions are precarious [2]. The annual number of disability-adjusted life years (DALYs) lost for this disease has been estimated to be up to 3.5 million in 2015 [3].

The most clinically relevant schistosome species are *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *S. haematobium*, and *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*), owing to the development of morbidities that particularly affect the intestine, the bladder, the spleen, and the liver [4, 5]. Chronic infection by *S. japonicum* and *S. mansoni* causes the hepatointestinal and hepatosplenic forms, which are quite frequent in endemic areas [5]. Liver pathology caused by *S. mansoni* and *S. japonicum* is triggered by soluble egg antigens that attract an inflammatory response mediated by Th2 cells, inducing the formation of granulomas around the egg. Over time, liver stellate cells are activated, and the fibrosis process is triggered [1].

In this process, epigenetic mechanisms may regulate gene expression and modulate the immune and inflammatory response. One of the epigenetic factors that we have highlighted in this review is the role of microRNAs. These post-transcriptional regulators silence the expression of genes by binding to a target region of the messenger RNA or through the process of deadenylation in the poly-A chain [6]. They can be found in several body fluids, circulating in the extracellular environment, transported by vesicles, and incorporated by cells [8, 9, 10].

Concerning the use of microRNAs as biomarkers of inflammation and prognosis of liver diseases, this study aimed to describe the main human microRNAs identified in non-

experimental studies, associated with disease aggravation in people infected with *S. mansoni* and *S. japonicum*.

## **2. Methods**

### ***2.1 Research strategies***

The following databases were used as a data source: Pubmed, Medline, Science Direct, Directory of Open Access Journals, Scielo, Medcarib, and Global Index Medicus. The searches took place from August 2020 to September 2020. For data mapping, descriptors were determined, arranged according to the possible combinations between the transcriptional regulator (microRNA), disease terms, and the parasite, namely: “*Schistosomiasis, bilharziasis, Katayama fever (AND), microRNA, miRNA, Primary microRNA, Primary miRNA, Small Temporal RNA, pre miRNA, pri miRNA, stRNA (AND) Schistosoma, Bilharzia*”.

Thus, the search was performed with 48 different combinations, using the Boolean operator *and* in each intersection, in a total of 336 searches in the seven databases. No filter was used for period or language. The inclusion criterion was articles dealing with the expression of human microRNAs in people infected with *S. mansoni* and/or *S. japonicum*, in any period and language. The following exclusion criteria were determined: articles with experimental models, gray literature, literature review, and studies with the intermediate host were not selected. This initial step was conducted by three researchers who read titles and abstracts, following the guidelines of the PRISMA platform.

### ***2.2 Data management***

After selection by titles and abstracts, another three independent researchers read the selected articles in full to exclude those that had been selected in the first screening but still fit within the exclusion criteria, and they also excluded repeated articles.

Among the articles included, when microRNAs were found by next-generation sequencing or microarray, only those validated by qPCR and later analyzed by Operating Characteristic Curve - ROC were considered to be the most important and will be discussed below.

### **3. Results**

#### ***3.1 Review results and study populations***

A total of 5,221 articles were found, of which 5,187 were excluded, after applying the eligibility criteria; 34 articles were eventually selected. With the second screening, another 29 articles were excluded, leaving five articles included in this review, as shown in Figure 1. The study populations are comprised of Chinese (n=2) [11, 12] Filipinos (n=2) [8, 10], and one of the studies did not reveal the origin of the human population [13].

#### ***3.2 MicroRNA expression***

A total of 135 microRNAs associated with schistosomiasis during human infection were found, compared to individuals without the disease. These data were collected from expression analysis by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), using specific primers, through next-generation sequencing by the Illumina platform, or by the Agilent Human microRNAs Microarray method (Table 1). However, after the use of filters and confirmation by Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR), only 16

microRNAs from humans (hsa) infected with *S. japonicum* [8, 10, 11] remained statistically significant, namely: hsa-miR-150-5p; hsa-miR-let-7a-5p; hsa-miR-let-7d-5p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR146b-5p; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-532-5p; hsa-miR-4521; hsa-miR-31-3p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-138-5p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-143-3p; hsa-miR-663b.

**Table 1 Characteristics of selected studies and microRNAs found.**

Population	Study design	<i>Schistosoma spp.</i>	Sample	Methodologies	MicroRNAs	Reference
China	Transversal	<i>S. japonicum</i>	Liver tissue	Illumina Seq AND qPCR (Taqman-Stem loop method)	<p><b>Cases Vs Controls</b></p> <p><b>Upregulated</b> miR -150-5p; -146b-5p; -10a-5p; -138-5p; -143-3p; -199a-3p; -31-5p; -222; -221-3p</p> <p><b>Downregulated</b> miR-663b</p>	[11]
Philippines	Transversal	<i>S. japonicum</i>	Serum	qRT-PCR S-Poly (T) Method - Talling kit AND Stem loop method- TaqMan Kit	<p><b>Mild Vs Severe fibrosis</b></p> <p><b>Downregulated</b> miR-150-5p; let-7a-5p; let-7d-5p; miR-146a-5p</p>	[8]
Philippines	Transversal	<i>S. japonicum</i>	Serum	qRT-PCR S-Poly (T) Method - Talling kit AND Stem loop method- TaqMan Kit	<p><b>Mild and Severe fibrosis Vs No fibrosis</b></p> <p><b>Upregulated</b> miR-146a-5p; miR-532-5p</p> <p><b>Downregulated</b> miR-92a-3p</p>	[10]
No information	No information	<i>S. japonicum</i>	Serum	qRT-PCR Stem-loop method- TaKaRa Kit	<p><b>Cases Vs Controls</b></p> <p><b>Upregulated</b> miR-223</p>	[13]
China	Transversal	<i>S. japonicum</i>	Serum	Microarray Technology	<p><b>Cases Vs Controls</b></p> <p><b>Upregulated</b> miR-933;-1248; -243; -1236</p> <p><b>Downregulated</b> miR-326; -449a; -370; -520b; -518f; -519a; -186; -33a; -519e; -520c; -520f; -302b; -202; -526b; -452; -383</p> <p><b>Case Vs Treated</b></p> <p><b>Upregulated</b> miR-27b; miR-152; miR-27a; miR-1293; miR-1324; miR-31</p> <p><b>Downregulated</b> miR-200b; miR-432; miR-</p>	[12]

512; miR-140; miR-103a;  
miR-1285; miR-433; miR-  
449a; miR-27a; miR-892b;  
miR-519d; miR-665; miR-  
200a; miR-510; miR-520b;  
miR-376a; miR-1244; miR-  
146a; miR-375; miR-383

---

Cabantous et al. [11] performed next-generation sequencing using Illumina technology (Illumina Technologies, United States), and they found 68 differentially expressed microRNAs from the liver tissue of *S. japonicum* infected patients (n=22) treated at the hospital in Yueyang (China), compared with healthy liver tissue, provided by the Curie Institute in France (n=19). Forty-three microRNAs were upregulated, and 25 were downregulated; however, after correction by Benjamini-Hochberg, only four microRNAs remained significant (hsa-miR-4521, hsa-miR-663b, hsa-miR-4417, and hsa-miR-31 -5p). In addition to these, 12 more microRNAs were chosen, by lists of miRNAs potentially associated with liver fibrosis in mice and in human, in order to limit the possible bias of cases (Chinese) and controls (French) that do not have the same origin, namely: miR-150-5p, miR-146b-5p, miR10a-5p, miR-138-5p, miR-143-3p, miR-199a-3p, miR-221-3p, miR-222-3p. Of these 12 selected microRNAs, 10 were upregulated (miR-150-5p; 146b-5p; miR-10a-5p; miR-138-5p; miR-143-3p; miR-199a-3p; miR-31-5p; miR -222-3p; miR-221-3p) while miR-663b was downregulated with fibrosis.

Wei et al. [12] performed the Microarray technique (Agilent Technologies, United States) in individuals treated at the Institute of Prevention and Control in Jiangsu (China), and found 20 microRNAs differentially expressed in serum samples from patients with newly-developed advanced schistosomiasis (n. =10), compared to healthy controls (n=10); 4 of them were upregulated (miR-933; miR-1248; miR-1243; miR-1236) and 16 were downregulated (miR-326; miR-449a; miR -370; miR-520b; miR-518f; miR-519a; miR-186; miR-33a; miR-519e; miR-520c; miR-520f; miR-302b; miR-202; miR-526b; miR-452 ; miR-383).

Furthermore, another 26 microRNAs were differentially expressed between patients with schistosomiasis history group (n=10), compared to healthy controls (n=10), of which 6 were upregulated (miR-27b; miR-152; miR-27a; miR -1293; miR-1324; miR-31) and 20, downregulated (miR-200b; miR-432; miR-512; miR-140; miR-103a; miR-1285; miR-433; miR-449a; miR-27a ; miR-892b; miR-519d; miR-665; miR-200a; miR-510; miR-520b; miR-376a; miR-1244; miR-146a; miR-375; miR-383), while miR-383, miR-449a, and miR-520b were significantly inhibited in the groups of patients with newly-developed advanced schistosomiasis and patients with schistosomiasis history compared to healthy controls.

He et al. [8], Cai et al. [10], Cai et al. [13] selected microRNAs for analysis using literature data on dysregulated microRNAs in other common liver diseases, owing to the scarcity of human studies on epigenetics in schistosomiasis, as evidenced in this review. He et al. [13] selected 6 microRNAs for study (miR-223; miR-146b; miR-199a-5p; miR-199a-3p; miR-122; miR-34a), however, only miR-223 had higher levels in serum samples in patients with schistosomiasis than in controls.

When performing a systematic review, Cai et al. [8] adopted 11 microRNAs described in 5 articles of the review. After analyzing the expression of these microRNAs in C5BL/6 mice during *S. japonicum* infection, six microRNAs were chosen to be analyzed in a human cohort (n=163) from an endemic area in the Philippines. Levels of 4 microRNAs (miR-150-5p; let-7a-5p; let-7d-5p; miR146a-5p) were downregulated with liver fibrosis and were significantly lower in patients with grade II-III fibrosis, compared to no fibrosis or grade I.

Cai et al. [10], to identify more stable exosomal microRNAs (exomiRs), used the geometric mean of four methods (NormFinder, GeNorm, BestKeeper, Delta Ct) in expression stability analysis during qPCR. Thus, they studied the stability of 12 exomiRs in 42 individuals from northeast Samar, Philippines. Among them, miR-425-5p was the most stable, which was later



used as a reference for correlation analysis (Sperman) with the different degrees of fibrosis of the liver parenchyma.

In this analysis, two exomiRs, miR-103a-3p and miR-181a-5p, were positively correlated with the degrees of liver fibrosis in the 42 clinical samples tested. These two afore-mentioned exomiRs, along with nine exomiRs, initially selected by murine model expression data during *S. japonicum* infection, were validated in a cohort of patients with japonic schistosomiasis (n=104), of which two exomiRs: miR -146a-5p and -532-5p were inversely correlated with liver fibrosis compared to those without fibrosis ( $p=0.0097/r=-0.25$  and  $p=0.0156$ , respectively; Spearman's  $r$ ). Furthermore, patients with severe hepatic fibrosis have lower levels of miR -146a-5p and -532-5p, when compared to the group without fibrosis ( $p=0.0325$  and  $p=0.0020$ , respectively; Mann Whitney test). MiR-92a-3p was significantly higher in individuals with mild and severe fibrosis (0-I), compared to the group without fibrosis ( $p=0.0325$ ),. In the other eight exomiRs in this study, there were no significant results.

Among all the microRNAs mentioned above, six human microRNAs were validated by the ROC (Receiver Operating Characteristic) test and will be discussed in the present study. The hsa-miR-146-5p microRNA showed values in the area under the curve (AUC) of 0.6575 in serum samples ( $p=0.0005$ ) to discriminate mild (grade 0 and 1) and severe fibrosis levels (grade 2 and 3) [8] and 0.6315 when extracted from exosomes ( $p=0.0329$ ) to discriminate mild to severe degrees compared to those without fibrosis [10]. The microRNAs hsa-miR-150-5p, hsa-let-7a-5p, and hsa-let-7d-5p were also evaluated in serum to differentiate different degrees of fibrosis and obtained AUC values above 0.62 [8]. The exomiRs hsa-miR-92a-3p and hsa-miR-532-5p presented values above 0.63, considering the degrees of fibrosis (I-III) compared to without fibrosis [10].

#### **4. Discussion**

The purpose of this review was to identify in human studies, the relative expression of microRNAs associated with aggravation of the disease, since experiments have the purpose of controlling phenomena and aspects that may interfere with the result; thus, they become artificial. Human populations that suffer with schistosomiasis as an endemic disease have a prevalence of the chronic form, unlike what happens in the infection in an animal model, which does not representatively have the chronic infection that occurs in humans. Unfortunately, there is a small number of studies approaching microRNAs in schistosomiasis, especially in humans. Consequently, only articles developed in Asian populations and individuals with *S. japonicum* infection were found.

There was also methodological variability in the selection of the microRNAs analyzed, which were chosen on the basis of the literature of other etiologies, microarrays or NGS. Although this can offer a broad view in the election of microRNAs as biomarkers, it hinders a comparison between studies. In addition, NGS and microarray require a validation step by qPCR with a higher sample size, but this approach was not performed by Wei et al. Another characteristic that makes comparisons between the authors difficult is the choice of the study biological material, since the relative expression of miRNA may be different between the tissues analyzed.

The lack of information in the studies complicate the interpretation and comparison of the data. For these reasons, we consider the microRNAs evaluated by pPCR and analyzed by ROC curve safer for use in future studies, with the most prominent being miR-146a-5p, -150-5p, let-7a-5p, let-7d-5p, -532-5p, and miR-92a-3p. These microRNAs were seen in other studies in the following discussion, with the potential to regulate the activation of Hepatic Stellate Cells (HSC) and fibrogenesis through modulation in the main signaling pathways associated with hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma, namely: TGF $\beta$ /SMAD and WNT/ $\beta$ -catenin.

#### ***4.1 miR-146a-5p***

In C5BL/6 mice infected with *S. japonicum*, the microRNA 146a-5p presented a significantly low expression, circulating in serum, in the fourth week of infection until the thirteenth week [8], and in exosomes from the fourth week to seventh [10]. In addition, it showed a negative expression, significantly correlated with liver fibrosis and granulomas in infected C5BL/6 and BALB/c mice, compared to controls [8].

*In vitro* assays have shown that the miR-146a-5p microRNA can inhibit the activation and proliferation of hepatic stellate cells (HSC) by suppressing the expression of genes and profibrotic proteins  $\alpha$ -SMA, Col-1, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); moreover, it increased the expression of SMAD7. The deregulated and negative expression of this microRNA in non-alcoholic fibrosing steatohepatitis (induced by a methionine-choline-deficient diet) promotes an increase in the expression of *Wnt1* and *Wnt5A* proto-oncogenes that activate the canonical pathway in liver tissue of mice [14].

In another meta-analysis study, using the Gene Expression Omnibus (GEO) database, two microarrays (GSE21362 and GSE22058) exhibited a significant diagnostic value of miR-146a-5p in hepatocellular carcinoma (GSE21362; AUC = 0.749, 95% CI: 0.669–0.830,  $p < 0.001$ . GSE22058; AUC=0.801, 95% CI: 0.731–0.872,  $P < 0.001$ ). These microarrays demonstrated that miR-146a-5p expression was significantly lower in tissues with hepatocellular carcinoma than in controls [15].

#### ***4.2 miR-150-5p***

In the study of Cabantous et al. [11], miR-150-5p was positively correlated with fibrosis in liver tissue, comparing Chinese infected by schistosomiasis versus French as a control. Similarly, in the GEO data analysis, when comparing 46 liver samples from control subjects with 55 liver samples with liver fibrosis due to different etiologies, there was a significantly higher expression in the HCV-induced liver fibrosis groups ( $1654.0 \pm 1010.2$  vs.  $297.3$ ,  $p < 0.001$ ) in GSE40744, by primary sclerosing cholangitis ( $994.5 \pm 917.8$  vs.  $399.4 \pm 60.9$ ,  $p = 0.014$ ) in GSE49012, and by induced fibrosis in HBV/HCV co-infection ( $1256.2 \pm 613.1$  vs.  $223.4 \pm 83.7$ ,  $p < 0.001$ ) in GSE63046 [15].

However, when the expression was analyzed circulating in serum or through exosomes, miR-150-5p was negatively correlated in different degrees of fibrosis [8, 10]. The same result was found by [17], with miR-150-5p being downregulated in the serum of Egyptian patients with cirrhosis and HCV ( $n=20$ ), compared to patients without cirrhosis/HCV positive result ( $n=20$ ) ( $p = 0.024$ ).

As previously explained, the levels of this miR may vary according to the biological material analyzed, and further studies are needed to evaluate the expression of this microRNA present in liver tissue and serum sample from the same individuals with chronic schistosomiasis, to better define the expression profile of this microRNA.

miR-150-5p may also vary its expression according to the stage of evolution of liver fibrosis and may have decreased expression in the early stages but increased expression in the progression. In rodent models, carbon tetrachloride (ccl4) was used to induce liver fibrosis. After 4, 8, and 12 weeks, liver samples from the left lateral lobe were collected for histochemical and miR-150-5p expression analysis; it was demonstrated that after 4 weeks of ccl4 poisoning in rodent livers, expression was significantly decreased in all rodent models, but after 8 and 12 weeks of poisoning, expression increased significantly (2.4 fold;  $p = 0.035$  and  $p = 0.024$ , respectively) [16].

miR-150-5p was associated with cardiac fibrosis, through the pathway activation of TGF- $\beta$ 1/Smad2-3 by inhibiting SMAD7. Conversely, the inhibition of this miRNA increases the expression of SMAD7, which in turn negatively regulates the pro-fibrogenic pathway TGF- $\beta$ 1/Smad2-3 and inhibits the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) - considered to be a mediator of inflammation. The inhibition of this miRNA, leading to a reduction in NF- $\kappa$ B, was also associated with a reduction in injury caused by increased glucose in cardiac fibroblasts (Che et al., 2019). [18]

#### **4.3 *let-7a-5p* e *let-7d-5p***

The let 7 family members are abundant in several types of cells and have a sequence between nucleotide 2 and 8, which is essential in target gene recognition. Decreased levels of members of this family can activate the fibrogenic process through the TGF- $\beta$  signaling pathway [19, 20].

A study of 84 Japanese people with chronic HCV infection showed that serum levels of *let-7a-5p* significantly decreased in 25 patients with advanced fibrosis (F4) compared to grades F1 (n=20), F2 (n=20), and F3 (n=19), or compared to the combined F1-F3 groups (p<0.001 for each comparison) [20], corroborating the findings of Cai et al. [8] included in this review, i.e., *let-7a-5p* microRNA expression was significantly low in the serum of patients with advanced fibrosis grades (II and III) compared to patients without fibrosis or with mild fibrosis (I) caused by *S. japonicum* (p=0.0004).

The levels of *let-7a-5p* and *let-7d-5p* microRNAs in the plasma of 32 patients with chronic hepatitis C were correlated with the severity of the liver disease, with a negative expression correlated with FIB-4 (r= -0.383 and - 0.285, respectively, and p<0.001 in both) and APRI (r= -0.345 and -0.240; p<0.001 and p=0.007), were also positively correlated with platelet count

( $r=0.318$  and  $0.192$ ;  $p<0.001$  and  $p= 0.03$ , respectively). In this study, ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC =  $0.776$  and  $0.79$ , respectively for let-7a-5p and let-7d-5p) was comparable to platelet count and to the APRI test (AUC =  $0.746$  and  $0.788$ , respectively), [19]i.e., it was higher than the values found by Cai et al. (2018) [8] ( $0.776$  vs  $0.659$  for let-7a-5p and  $0.79$  vs  $0.62$  for let-7d-5p).

#### **4.5 miR-92a-3p**

Previous studies have shown that miR-92a-3p is among the most abundant exomiRs in the profile of vesicles secreted by induced pluripotent stem cells (iPSCs), which may present about 10% of the expression in these cells, and thus contribute to liver tissue regeneration, acting in the transformation of hepatic stellate cells to the inactive or quiescent phenotype [22,23].

This may suggest that miR-92a-3p may induce antifibrotic effects, with a high level of expression in the early stages of liver fibrosis, and could delay the fibrosis process. However, according to the findings of Cai et al [10], this miRNA showed high levels in individuals with mild and severe fibrosis than in individuals without fibrosis.

In a study of 282 subjects with chronic hepatitis B, the expression of exosomal serum miR-92a-3p was associated with progression and aggravating of fibrosis, following Scherver's classification for liver biopsy histopathology. The greater the degree of hepatic impairment, the greater the expression of miR-92a3p, corroborating the findings by Cai et al [10]. When the relative expression of this microRNA was compared with other non-invasive tests to discriminate cirrhosis, through the ROC curve, miR-92a-3p showed AUC ( $0.89$ , 95% CI  $0.85-0.93$ ) greater than APRI ( $0.78$ , 95% CI  $0.73-0.83$ ,  $P=0.014$ ) FIB4 ( $0.82$ , 95% CI  $0.77-0.86$ ,  $P=0.088$ ) and LSM ( $0.88$ , 95% CI  $0.84-0.92$ ,  $P=0.796$ ) [24].

Interestingly, in iPSCs induced to differentiate into chondrocytes by means of TGF- $\beta$ 3, miR-92a-3p contributed positively to the expression of TGF- $\beta$ 3 from day 7, reaching its higher point at day 21 and following a sharp decline, with upregulation of *WNT5* expression in exosomes from day 21 to day 28. In this study, miR-92a-3p was also capable to inhibit MMP13 expression after 14 days (Mao et al., 2018). [25]

In hepatic fibrogenesis, TGF- $\beta$ 3 plays a key role in the upregulation of profibrogenic genes, and it downregulates the expression of MMP-13 (Guo et al, 2021)[26]; thus, if miR-92a-3p promotes the expression of TGF- $\beta$ 3 and contributes to the inhibition of metalloproteinases, then it acts in profibrotic processes; by contrast, the *WNT5* gene is involved in the proliferation of fibroblasts and resistance of apoptosis, contributing to an increase in extracellular matrix deposition by increasing the production of fibronectin and  $\alpha$ -5 integrin (Vuga et al, 2009) [27].

Thus, we raise a caveat in the use of miR-92a-3p in the therapeutic aspect, inducing its expression in iPSCs, since the metabolic pathways involved simultaneously must be studied in more depth. In contrast, the use of this miRNA as a biomarker of liver fibrosis is more promising.

#### **4.6 miR-532-5p**

Few studies have reported this microRNA in liver diseases; however, its antiproliferative effect on cells of the nucleus pulposus of the intervertebral disc was shown, through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, to directly target the Bcl-9 protein, reduce translocation of the anti-apoptotic protein Bcl2 to the mitochondria and activate caspase-3. After treating the cells with mimicked mir-532, apoptosis of these cells increased from 1.04% to 24.69% [28] .

This effect of the increased expression of miR-532-5p, which promotes apoptosis in cells of the nucleus pulposus of the vertebral disc, is not favorable in the degeneration of the vertebral disc; however, in cancer diseases, this regulatory activity would be significant. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway promotes the organization of TGF- $\beta$ -induced fibrosis in several cells [12, 29], and the regulatory activity in this pathway by miR-532 could have an essential role in preventing fibrosis formation in liver tissue during schistosomiasis.

In gastric cancer, the expression of miR-532-5p also showed a negative expression, and the cause of this dysregulation was the aberrant expression of a long non-coding RNA (lncRNA)-LINC01410, another class of non-transcribed RNAs with regulatory function, silencing of miR-532-5p and increasing NF- $\kappa$ B activity [30].

## 5. Conclusion

Epigenetic studies of microRNAs in patients with schistosomiasis are very scarce compared to other liver diseases. However, in the few articles addressed in this review, there was a large number of microRNAs that can be further explored, and some stand out as being strongly associated with stages of fibrosis in the analyses performed by the ROC curve (miR-146a-5p, miR-150 -5p, let-7a-5p, let-7d-5p, miR-92a-3p, and miR-532-5p). These results need to be further studied in other endemic regions, sub-Saharan Africa and America, with *S. mansoni*.

## Expert Opinion

Schistosomiasis is a neglected disease of great social impact and is among the most worrisome parasitosis in the world due to its morbidity and mortality rates. Because of this fact and the high prevalence of this disease, the World Health Organization (WHO) has acknowledged the relevance of schistosomiasis to public health since 1948, and it recommends the large-scale treatment with praziquantel in populations at high risk of infection along with other complementary measures based on access to potable water,



sanitation and health education through intersectoral collaboration as a means of reducing transmission [31].

However, even if control and treatment are suggested by the WHO, schistosomiasis has not been eliminated and remains endemic in many countries with difficulties in the supply of drinking water, sanitation and education; Thus, there are new scenarios of transmission and prevalence of the disease, increasing the costs indirectly caused by schistosomiasis, such as premature death and sickness aid [31].

The prognosis for hepatic fibrosis as a result of infections is performed late and there are no effective measures in the treatment of chronic patients in the recovery of hepatosplenic tissue and other organs. This is due to a lack of consistency in the different health systems adopted by each country affected by schistosomiasis, i.e., there are deficiencies in individual follow up, epidemiological surveillance and prevention measures.

Therefore, experimental epigenetic studies *in vitro* and *in vivo*, related to post transcriptional regulation by microRNAs in *Schistosomiasis mansoni*, reveal potential markers to prognosis and contributes to the knowledge of gene pathways and proteins linked to the clinical features promoting the identifications of therapeutic targets.

These contributions are possible because of the advancement of New Generation Sequencing (NGS) technology, such as the RNA sequencing methodology performed by Cabantous et al. (2017)[11], which maps all differentially expressed microRNAs in the liver of patients with fibrosis for comparison to healthy tissue of donors. Moreover, with the support of bioinformatics, one can infer in the pathways that are being regulated at the time of evolution of granulomas, transformation of hepatic stellate cells and the development of fibrosis. Thus, the production of drugs and/or therapies to reduce the progress in the clinical features of these chronic patients is not such a distant reality.

However, there is a lack of studies with different populations and in schistosomiasis caused by *Schistosoma mansoni*. Having found a profile of upregulated or downregulated microRNAs working in gene expression and contributing to fibrosis, the techniques need to be standardized, considering that each published study has used different biological samples such as serum, whole blood, liver tissue and exosomes. Also, the techniques of amplification and the type of endogenous control were different, which hinders the normalization of the analysis of expression and interpretation of the data.

Therefore, the use of microRNAs as biomarkers has not been well defined in schistosomiasis yet, which requires studies that reproduce clinical trials in different types of populations, using the most promising microRNAs of baseline studies and reducing analytical variables.

Thus, one should investigate the sensibility and specificity of each chosen microRNA, with a high number of individuals infected by *S. mansoni* and/or *S. japonicum*.

While in these years no new forms of treatment, diagnosis and prognosis were developed and tested, more than 3.5 million of disability-adjusted life years (DALY) were caused by schistosomiasis. According to WHO until 2015, more than a million years of life were lost due to premature death and 2.5 million years of life were lost because of disability.

**Funding:**

This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Funding code 001. It was also funded by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEP) - Finance cod: IBPG-1686-2.02/19.

**Declarations of interest:** none.

**References**

- [1] McManus DP, Dunne DW, Sacko M, et al. Schistosomiasis. Nat. Rev Dis. Primers. 2018;4:13. DOI:10.1038/s41572-018-0013-8
- [2] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, et al. Human schistosomiasis. Lancet. 2014;383:2253-2264.
- [3] Mitra AK, Mawson AR. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. Trop. med. and infect. disease. 2017;2(3):36.
- [4] Gomes ECS, Domingues ALC, Barbosa CS. Esquistossomose: Manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. Recife (PE): Fiocruz Pernambuco; 2017.
- [5] LoVerde PT. Schistosomiasis. Adv Exp Med Biol. 2019;1154:45-70. Doi: 10.1007/978-3-030-18616-63. PMID: 31297759.
- [6] Sujay P, Ruiz-Manriquez LM, Serrano-Cano FI, et al. Human microRNAs in host–parasite interaction: a review. 3 Biotech. 2020;10(12):1-16.

- [7] McManus DP, Bergquist R, Cai P, et al. Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines. In *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg. 2020;42(3):355-371.
- [8] Cai P, Mu Y, Olveda RM, et al. Circulating miRNAs as footprints for liver fibrosis grading in schistosomiasis. *EBioMedicine*. 2018;37:334-343.
- [9] Samoil V, Dagenais M, Ganapathy V, et al. Vesicle-based secretion in schistosomes: analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-16.
- [10] Cai P, Mu Y, Olveda RM. Serum Exosomal miRNAs for Grading Hepatic Fibrosis Due to Schistosomiasis. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(10):3560.
- [11] Cabantous S, Hou X, Louis L, et al. Evidence for an important role of host microRNAs in regulating hepatic fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitology*. 2017;47(13):823-830.
- [12] Wei C, Chen D, Lu Y, et al. Expression profiles of circulating microRNAs in newly-developed advanced schistosomiasis patients. [*Chinese Journal of Schistosomiasis Control*]. 2017;29(6):788-790. Chinese.
- [13] He X, Sai X, Chen, C, et al. Host serum miR-223 is a potential new biomarker for *Schistosoma japonicum* infection and the response to chemotherapy. *Parasites Vectors*. 2013;6:272 DOI: 10.1186/1756-3305-6-272
- [14] Du J, Niu X, Wang Y, et al. MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci Rep*. 2015;5:6163. DOI:10.1038/srep16163
- [15] Zhang X, Ye ZH, Liang HW, et al. Down-regulation of miR-146a-5p and its potential targets in hepatocellular carcinoma validated by a TCGA-and GEO-based study. *FEBS Open Bio*. 2017;7(4), 504-521.

- [16] Chen W, Yan X, Yang A, et al. miRNA-150-5p promotes hepatic stellate cell proliferation and sensitizes hepatocyte apoptosis during liver fibrosis. *Epigenomics*. 2020;12(1),53–67.
- [17] Shaheen, NMH, Zayed N, Riad NM, et al. Role of circulating miR-182 and miR-150 as biomarkers for cirrhosis and hepatocellular carcinoma post HCV infection in Egyptian patients. *Virus research*. 2018;255,77-84.
- [18] Che H, Wang Y, Li Y, et al. Inhibition of microRNA-150-5p alleviates cardiac inflammation and fibrosis via targeting Smad7 in high glucose-treated cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2019;1–11. <https://doi.org/10.1002/jcp.29386>
- [19] Matsuura K, De Giorgi V, Schechterly C, et al. Circulating let-7 levels in plasma and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2016;64(3),732-745.
- [20] Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in cell biology*. 2008;18(10), 505-516.
- [21] Matsuura K, Aizawa N, Enomoto H, et al. Circulating let-7 Levels in Serum Correlate With the Severity of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Open forum infectious diseases*. 2018;5(11),268.
- [22] Povero D, Pinatel EM, Leszczynska A, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles reduce hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *JCI Insight*. 2019. 11;5(14):e125652. PMID: 31184999.
- [23] Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, et al. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(5):749-58. PMID: 19284351.
- [24] Wang Q, Hu Q, Huang C, et al. Using Next-generation Sequencing to Identify Novel Exosomal miRNAs as Biomarkers for Significant Hepatic Fibrosis. *Discovery Medicine*. 2021;31(164):147-159. PMID: 35188889.

- [25] Mao G, Zhang Z, Hu S, Zhang Z, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Sep 26;9(1):247. doi: 10.1186/s13287-018-1004-0. PMID: 30257711; PMCID: PMC6158854.
- [26] Guo J, Liu W, Zeng Z, et al. Tgfb3 and Mmp13 regulated the initiation of liver fibrosis progression as dynamic network biomarkers. *J Cell Mol Med.* 2021;25(2):867-879. doi: 10.1111/jcmm.16140. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33269546; PMCID: PMC7812286.
- [27] Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, et al. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Nov;41(5):583-9. doi: 10.1165/rcmb.2008-0201OC. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19251946; PMCID: PMC2778165.
- [28] Sun Z, Jian Y, Fu H, et al. MiR-532 downregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling via targeting Bcl-9 and induced human intervertebral disc nucleus pulposus cells apoptosis. *J. Pharm. Sci.* 2018;138(4), 263-270.
- [29] Kondo N, Yuasa T, Shimono K, et al. Intervertebral disc development is regulated by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Spine.* 2011;36(8), E513. PMID: 21270710.
- [30] Zhang JX, Chen ZH, Chen DL, et al. LINC01410-miR-532-NCF2-NF-kB feedback loop promotes gastric cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene.* 2018;37, 2660-2675.
- [31] World Health Organization. Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. Geneva: WHO Library; 2013.

### **Legends to Figures:**

Figure 1. Flowchart of the systematic review, criteria used and main microRNAs found