



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JEAN VÍCTOR CORRÊA DA SILVA

**DETECÇÃO DE IgG4 ESPECÍFICA PARA ANTÍGENOS DE
VERMES ADULTOS DE *S. manson* PARA O DIAGNÓSTICO
IMUNOLÓGICO EM ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE**

Recife
2022

JEAN VÍCTOR CORRÊA DA SILVA

**DETECÇÃO DE IgG4 ESPECÍFICA PARA ANTÍGENOS DE
VERMES ADULTOS DE *S. manson* PARA O DIAGNÓSTICO
IMUNOLÓGICO EM ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo
Correia do Nascimento.

Coorientador: Prof. Dra. Elaine Christine
de Souza Gomes.

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Jean Víctor Corrêa da.

Detecção de IgG4 específica para antígenos de vermes adultos de *S. mansoni* para o diagnóstico imunológico em área de baixa endemicidade / Jean Víctor Corrêa da Silva. - Recife, 2022.

55 p : il., tab.

Orientador(a): Wheverton Ricardo Correia do Nascimento

Cooorientador(a): Elaine Christine de Souza Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. ELISA. 2. Soroprevalência. 3. Imunodiagnóstico. 4. Imunoglobulinas. 5. Esquistossomose mansônica. I. Nascimento, Wheverton Ricardo Correia do . (Orientação). II. Souza Gomes, Elaine Christine de . (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

JEAN VÍCTOR CORRÊA DA SILVA

**DETECÇÃO DE IgG4 ESPECÍFICA PARA ANTÍGENOS DE VERMES
ADULTOS DE *S. manson* PARA O DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO
EM ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 30/06/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE / Área Acadêmica de Medicina Tropical -
CCM

Prof. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE / Área Acadêmica de Medicina Tropical -
CCM

Prof. Dr. Walter Lins Barbosa Junior
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE / Departamento de Parasitologia

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços para me proporcionar uma boa educação e me auxiliar e fortalecer em qualquer momento da minha vida. Sobretudo, dedico este trabalho aos meus falecidos avós, Severina Costa e Waldir Ferreira, que foram e ainda são muito especiais na minha vida, me apoiaram e cuidaram de mim até seus últimos momentos. Suas lembranças me inspiram e me fazem continuar seguindo. Eternas saudades e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento, por toda paciência, orientação, apoio e confiança no desenvolver do presente trabalho. Agradeço por me proporcionar tantos ensinamentos acadêmicos e pessoais ao longo desses anos. Por ser meu mentor em diversas atividades acadêmicas e também pela compreensão e todas as conversas que me enriqueceram como estudante e também como pessoa.

A minha coorientadora, Dra. Elaine Christine de Souza Gomes, por toda ajuda e conhecimento repassado ao longo do trabalho. Assim como a todos os colegas de laboratório, Maria Eduarda e Dalton Willians, aos técnicos Fernando, Barnabé e Fátima, assim como agradecer também ao Dr. Walter Lins e toda equipe do Laboratório de Referência em Esquistossomose (LRE), situado no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, por permitir e me ajudar a desenvolver o trabalho e por serem sempre muito prestativos e educados comigo e com meus colegas.

Agradecer também a Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa, por todo acompanhamento no projeto PET-Parasitologia que me proporcionou experiências e ensinamentos que levarei para toda vida, além de toda compreensão e ajuda nos momentos difíceis que me foi proporcionado por ela.

A todos os amigos que estiveram comigo, sobretudo, Adriana Silva, Ébano Vinícius, Eduarda Correia, Henrique Fernando, Leonardo Melo, Mariana Costa e Matheus Roberto, que me apoiaram e me ajudaram em todos os momentos que passei, tanto na graduação como na vida pessoal, compartilhando choros e muitos sorrisos ao longo desses anos, me levantando das quedas da vida, sobretudo nessa etapa final da graduação.

Gostaria de agradecer a todos os familiares e todas as pessoas que estiveram comigo nessa caminhada, como Deise Couto e sua família que me ajudaram muito. Agradecer principalmente a meus pais, José Bartolomeu e Luciana Corrêa, assim como meus avós, Severina Costa e Waldir Ferreira, por toda ajuda e amor incondicional que me proporcionam e por me acompanharem e sempre me fortalecerem na minha jornada. Em especial, ao meu pai, que é sem dúvidas a maior inspiração da minha vida, meu companheiro e parceiro de todos os momentos, meu grande herói e o exemplo de homem que um dia almejo ser. Sou eternamente grato a todos.

SILVA, J. V. C. **Detecção de IgG4 específica para antígenos de vermes adultos de *S. mansoni* para o diagnóstico imunológico em área de baixa endemicidade.** 2022. 56. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

No Brasil, estima-se que 2 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *S. mansoni*. O método Kato-Katz é indicado pelo Ministério da saúde para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. Em locais de baixa endemicidade, ocorre subestimação da prevalência real da doença devido aos casos falso-negativos, isso se deve por conta da baixa sensibilidade do método de Kato-Katz, que depende diretamente da quantidade de fezes examinadas e do número de ovos eliminados pelo portador. Assim, surge a necessidade de novos métodos, como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que detecta IgG4, o qual poderia ser empregado para identificação de infecção ativa. O objetivo do trabalho foi desenvolver um método de detecção de IgG4 para antígenos de vermes adultos (SWAP) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* em área endêmica de Pernambuco. Um estudo de corte transversal foi realizado em Porto de Galinhas, para validação do método de ELISA. Camundongos infectados com *S. mansoni* foram submetidos a eutanásia para coleta de vermes adultos. Por meio de sonicação, obtiveram-se os antígenos a partir de vermes adultos machos (SWAP) para posterior padronização e execução do teste. Também foi realizada uma correlação entre os níveis de IgG4, a carga parasitária, sexo e idade nas amostras analisadas durante o estudo. A realização do trabalho permitiu a utilização do método de ELISA para a detecção de anticorpos IgG4 específicos para a infecção pelo *S. mansoni*. No estudo, foi possível diferenciar os grupos apenas na leitura de 492nm, obtendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) para o IgG4 anti-SWAP, sensibilidade de 57,58% e especificidade de 79,33%, cujo grupo infectado com *S. mansoni* exibiu média de densidade óptica de 0,676 e desvio padrão ($DP \pm$) de 0,731, enquanto os não infectados apresentaram média duas vezes menor. A leitura de 450nm não demonstrou diferença significativa. Assim, foi possível obter um teste de ELISA aplicável para o IgG4 anti-SWAP na leitura de 492nm com capacidade de diferenciar indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados.

Palavras-chave: ELISA. Soroprevalência. Imunodiagnóstico. Imunoglobulinas. Esquistossomose mansônica.

SILVA, J. V. C. **Specific IgG4 detection for antigens from adult worms of *S. mansoni* for immunological diagnosis in low endemic area.** 2022. 56. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

In Brazil, it is estimated that 2 million people are infected with *S. mansoni*. The Kato-Katz method is recommended by the Ministry of Health for the diagnosis of schistosomiasis mansoni. In places of low endemicity, there is an underestimation of the real prevalence of the disease due to false-negative cases, this is due to the low sensitivity of the Kato-Katz method, which directly depends on the amount of feces examined and the number of eggs eliminated by the carrier. Thus, there is a need for new methods, such as the enzyme immunosorbent assay (ELISA), which detects IgG4, which could be used to identify active infection. The objective of this work was to develop an IgG4 detection method for adult worm antigens (SWAP) in individuals infected by *S. mansoni* in an endemic area of Pernambuco. A cross-sectional study was carried out in Porto de Galinhas, to validate the ELISA method. Mice infected with *S. mansoni* were euthanized to collect adult worms. By means of sonication, the antigens were obtained from adult male worms (SWAP) for later standardization and test execution. A correlation was also performed between IgG4 levels, parasite load, sex and age in the samples analyzed during the study. This work allowed the use of the ELISA method for the detection of specific IgG4 antibodies for *S. mansoni* infection. In the study, it was possible to differentiate the groups only in the 492nm reading, obtaining a statistically significant difference ($p < 0.0001$) for IgG4 anti-SWAP, sensitivity of 57.58% and specificity of 79.33%, whose infected group with *S. mansoni* showed a mean optical density of 0.676 and a standard deviation ($SD \pm$) of 0.731, while the non-infected showed a mean twice lower. The 450nm reading showed no significant difference. Thus, it was possible to obtain an applicable ELISA test for IgG4 anti-SWAP at 492nm reading capable of differentiating individuals infected by *S. mansoni* and uninfected.

Key words: ELISA. Seroprevalence. Immunodiagnosis. Immunoglobulins. Schistosomiasis mansoni.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição global das principais espécies do gênero <i>Schistosoma</i>	14
Figura 2: Distribuição espacial da mortalidade por esquistossomose no Brasil, em três períodos. (A) Distribuição espacial da taxa de mortalidade por esquistossomose. (B) Taxa de mortalidade suavizada pelo método Bayesiano Empírico Local..	16
Figura 3: Mapa de criadouros e focos de esquistossomose no litoral de Pernambuco e região metropolitana do Recife resultante da expedição científica de setembro de 2008.....	17
Figura 4: Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 5: Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção ocasionada pelo <i>S. mansoni</i>	27
Figura 6: A) Desenho esquemático da formação do granuloma, destacando células e componentes essenciais para seu desenvolvimento. B) Granulomas induzidos por ovos de <i>S. mansoni</i> no fígado de um rato infectado.....	29
Figura 7: Desenho esquemático do método de ELISA indireto	35
Figura 8: Comparação dos níveis de IgG4 entre indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> e não infectados.....	41
Figura 9: Comparação das Curvas ROC realizadas na leitura de 450nm e 492nm..	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da positividade no ELISA indireto para anticorpos IgG4 nos grupos de pacientes infectados pelo *S. mansoni* e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450nm e 492nm. 42

Tabela 2 - Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG4 anti-SWAP e o sexo, idade e carga parasitária de infectados e não infectados através de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492nm. 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 EPIDEMIOLOGIA	13
2.2 BIOLOGIA E CICLO EVOLUTIVO	18
2.3 FISIOPATOLOGIA	22
2.4 IMUNOPATOGENESE / IMUNOLOGIA	25
2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 METODOLOGIA	37
4.1 DESENHO DO ESTUDO	37
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
4.3 ÁREA DE ESTUDO E LOCALIDADES	37
4.4 INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO <i>S. mansoni</i> E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS	38
4.5 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO I	38
4.6 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO II	39
4.7 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO III	40
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	54
ANEXO A	54
ANEXO B	55

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma parasitose negligenciada, relacionada com áreas mais pobres, configurando um grave problema de saúde pública. A doença é predominante em zonas tropicais, sendo causada, principalmente, pelos trematódeos *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. As estimativas apontam que a doença afeta cerca de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo, e é endêmica em 78 países (CARDOSO *et al.*, 2012). Vários fatores estão relacionados à suscetibilidade à infecção, como genética, resposta imune, fatores comportamentais ou localização e calcula-se que cerca de 800 milhões de pessoas estão em risco de infecção (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

No Brasil, estima-se que 2 milhões de pessoas estejam infectadas. Destas, 80% estão localizadas na região Nordeste, predominando mais ao longo da costa litorânea e no trajeto de bacias hidrográficas (KATZ, 2018). No ano de 2016, 103 dos 185 municípios pernambucanos foram classificados como endêmicos, com predominância na Zona da Mata Norte e Zona da Mata Sul, e na Região Metropolitana do Recife. Nessas regiões, constataram-se localidades com até 5% de diagnóstico sorológico positivo, e no período de 2008 a 2014, foram registradas 473 hospitalizações pela doença (DUBEUX *et al.*, 2019). Vale ressaltar que em Pernambuco ocorreram 1.398 óbitos por causa básica de esquistossomose, no período de 2000 a 2007, e 1.238 óbitos entre 2008 a 2014, somando um total de 2.636 óbitos nesse intervalo de tempo, uma das maiores taxas do país (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A patogenia da esquistossomose está diretamente correlacionada com a resposta imune, em especial, a inflamação granulomatosa crônica, considerada uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia mediada por células T CD4+, com a participação de outras células e citocinas produzidas por linfócitos Th2, contra os ovos que ficam presos nos pequenos vasos intra-portais do fígado. A reação descontrolada favorece o desenvolvimento da fibrose no fígado. Na fase aguda da infecção, evidencia-se uma resposta do tipo Th1, representada pelo aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-12, TNF e IFN- γ , que estão ligadas à redução da fibrose. Com a deposição dos ovos, ocorre uma mudança na resposta imune, que se direciona para uma intensa resposta Th2, marcada pela produção de níveis elevados das IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e a síntese de IgE. Conforme a infecção avança para um

processo mais crônico, verifica-se uma imunomodulação da resposta Th2, conduzida pela IL-10 e TGF- β , que induzem as células T reguladoras (Tregs), que regulam o equilíbrio das respostas Th1/Th2 (WILSON *et al.*, 2007). A geração de imunoglobulinas do tipo IgM específicas contra os antígenos dos esquistossômulos também é iniciada na fase aguda da doença, que no desfecho, predomina uma resposta Th1, que sinaliza a troca de isotipo para a IgG (DEFRANCO; LOCKSLEY; ROBERTSON, 2007).

Existe uma diversidade de métodos diagnósticos para detecção da esquistossomose. Essas podem variar desde análise microscópica até abordagens moleculares mais elaboradas (CAI *et al.*, 2019). A recomendação do Ministério da Saúde para o diagnóstico da esquistossomose mansônica é preferencialmente o parasitológico de fezes pela técnica de Kato-Katz (BRASIL, 2014). Entretanto, em áreas onde a doença é de pouca gravidade, com manifestações leves e pouco específicas, e em casos com baixa carga parasitária, a prevalência real da doença fica subestimada, quando se emprega somente esse método para diagnosticar a esquistossomose. Isso se deve por conta da baixa sensibilidade do método de Kato Katz, que depende diretamente da quantidade de fezes examinadas e do número de ovos eliminados pelo portador (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O método de PCR, apesar de sua eficácia, apresenta o custo elevado como principal obstáculo em campanhas de rastreamento e como forma de diagnóstico (CAI *et al.*, 2019). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), por possibilitar a automação, além de proporcionar ensaios quantitativos, mostra-se um método bem adequado para aplicação em estudos populacionais. Entretanto, sua utilização na rotina laboratorial ainda é muito limitada, devido, sobretudo, à falta de reagentes comerciais aplicáveis ao diagnóstico da esquistossomose (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Além disso, é indicado em casos de baixa carga parasitária, já que permite diferenciar os indivíduos na fase aguda e crônica da doença (CAI *et al.*, 2019).

A respeito da funcionalidade dos anticorpos frente à esquistossomose em humanos, os isotipos IgG1, IgG2 e IgE são capazes de induzir a destruição de esquistossômulos *in vitro* por meio da citotoxicidade mediada por anticorpo, enquanto IgM, IgG2 e IgG4 não são capazes de mediar essa destruição *in vitro*. A IgG4, em especial, foi diretamente relacionada com a infecção da esquistossomose, mostrando que o aumento da reatividade de IgG4 frente a antígenos de ovos (SEA) e de vermes adultos (SWAP), eleva o risco de infecção por este parasita, tornando os indivíduos

mais suscetíveis, além disso, também foram verificados níveis mais elevados desse anticorpo em grupo de indivíduos reinfectedos, quando comparado aos não reinfectedos (MATOSO, 2012).

Evidenciou-se que o anticorpo IgG4 anti-SEA possui um poder de predição da infecção significativo, mas apesar disso, a capacidade preditiva deste biomarcador reduz com o passar do tempo. Possivelmente, este fato relaciona-se com a carga parasitária. Quando a média de ovos por grama de fezes está mais elevada, este biomarcador teve um maior poder de predição da infecção, e o inverso é verdadeiro, o que indica uma correlação direta das reatividades dos anticorpos IgG4 anti-SEA (MATOSO, 2012). Em contrapartida, níveis elevados de IgG4 anti-SWAP também foram associados a uma alta carga parasitária e com indivíduos mais expostos ao parasita, demonstrando que também possui esse tipo de relação (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O trematódeo *Schistosoma mansoni* é o agente causador da endemia parasitária, esquistossomose mansônica, considerada uma das principais doenças tropicais em países emergentes (BRASIL, 2014). Encontrada com frequência nas Américas, Ásia e África, possivelmente introduzida no Brasil através de escravos africanos, nos tempos da colônia portuguesa. Em 1851, a doença foi descrita pela primeira vez por Theodor Bilharz após uma necropsia no Egito, sendo denominada de Bilharziose, em referência ao médico alemão e, posteriormente, seria conhecida como esquistossomose (MCMANUS *et al.*, 2018).

No mundo, as estimativas apontam que aproximadamente 800 milhões de pessoas correm risco de adquirirem a infecção e cerca de 250 milhões de indivíduos estão infectados com alguma das espécies de *Schistosoma*, com cerca de 201,5 milhões dessas pessoas residentes no continente africano (UTZINGER *et al.*, 2009). No Brasil, a manutenção dessa parasitose deve-se, principalmente, pelo papel do hospedeiro intermediário, os moluscos. Entre eles, destacam-se três espécies principais, a *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Devido à sua

distribuição e eficiência de transmissão, o *B. glabrata* é o mais evidenciado no Brasil (MARCHIORI, 1999).

Considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tem sido um agravo constante nas zonas tropicais e subtropicais (STEINMANN *et al.*, 2006). A esquistossomose é endêmica em 78 países, com maior prevalência nas regiões de características tropicais, como África, Ásia e América Latina. Ademais, as localidades onde populações possuem níveis mais altos de desigualdade social e deficiências nos serviços de saúde detêm a doença mais predominantemente (KLOOS *et al.*, 2008), sendo causada principalmente pelas espécies *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* (MCMANUS *et al.*, 2018), possuindo uma ampla distribuição global, como pode ser observado na figura 1 (WEERAKOON *et al.*, 2015).

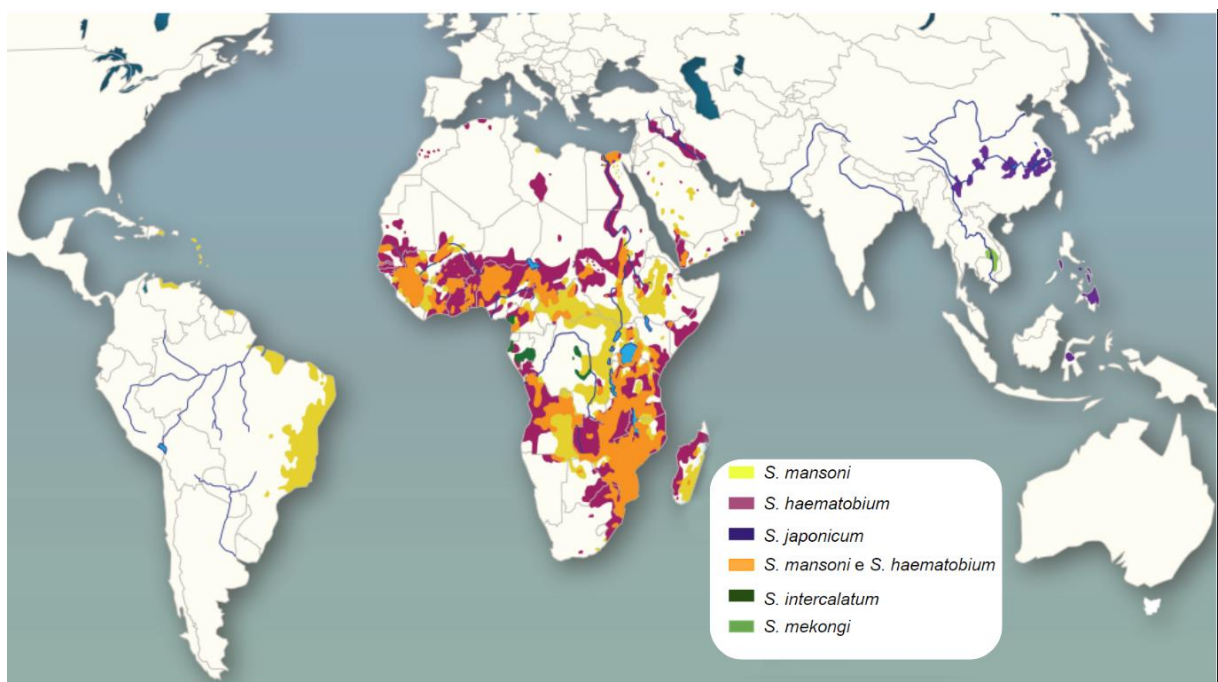


Figura 1: Distribuição global das principais espécies do gênero *Schistosoma*. Fonte: adaptada de WEERAKOON *et al.*, 2015.

A epidemiologia da esquistossomose possui características peculiares, como uma distribuição focal, uma vez que, mesmo dentro de uma área pequena, a intensidade e prevalência da infecção podem possuir níveis distintos e variáveis. Esse fato deve-se por questões atreladas ao ciclo biológico do parasita, interação humana com hospedeiros intermediários e o contato da população com água propícia para infecção (MCMANUS *et al.*, 2018). Outros fatores também são considerados

importantes para entender as questões epidemiológicas do agravo, como saneamento básico, acesso à água potável e atividades desenvolvidas pela população, sejam elas profissionais, domésticas ou de lazer, a exemplo da pesca, limpeza de louças, nado em lagos e rios, entre outros (GRIMES *et al.*, 2014)

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *Schistosoma mansoni* e a doença é considerada endêmica em 19 dos 27 estados brasileiros, sobretudo nos estados da região Nordeste (BRASIL, 2014). Estima-se que cerca de 2 milhões de indivíduos estejam infectados com *S. mansoni* e 42,9 milhões de indivíduos estejam em elevado risco de infecção e, destes, 80% vivem na região Nordeste, com uma prevalência bem mais acentuada ao longo do litoral e do trajeto das bacias hidrográficas (DUBEUX *et al.*, 2019).

Apesar de ter ocorrido uma redução no número de pacientes com formas hepatoesplênicas graves e queda das taxas de mortalidade da esquistossomose, após a implementação de programas de controles, ainda se mantém endêmica em muitos estados (OMS, 2017). Até o momento, a letalidade é considerada baixa, porém, ocorreram cerca de 508 óbitos por ano no país, entre 2006 e 2015, fatos que indicam deficiências nas ações de controle da doença no Brasil (SILVA DA PAZ *et al.*, 2021).

Entre os anos de 1999 e 2018, foram registrados 12.251 óbitos relacionados à esquistossomose no Brasil. Foi demonstrado que a maior taxa de mortalidade está concentrada entre os determinantes sociais, como homens com idade igual ou superior a 60 anos, com raça parda e, na maior parte das vezes, com baixa escolaridade (SILVA DA PAZ *et al.*, 2021). Tal fato pode ser explicado a uma maior exposição ao *S. mansoni*, devido a atividade profissional e de lazer exercida por essa parcela da população, uma vez que grande parte atua nas áreas de pesca e agricultura (MARTINS FERREIRA E PESSOA TABOSA, 2007). Além disso, a maior porcentagem dos óbitos registrados durante esse período são da região nordeste, principalmente em municípios da zona interiorana. Os estados de Alagoas, Sergipe e Pernambuco foram responsáveis por aproximadamente metade das mortes evidenciadas, configurando, assim, um grave problema de saúde pública que ainda persiste. Na figura 2, pode-se observar a distribuição espacial da mortalidade por esquistossomose no Brasil, em três períodos (SILVA DA PAZ *et al.*, 2021).

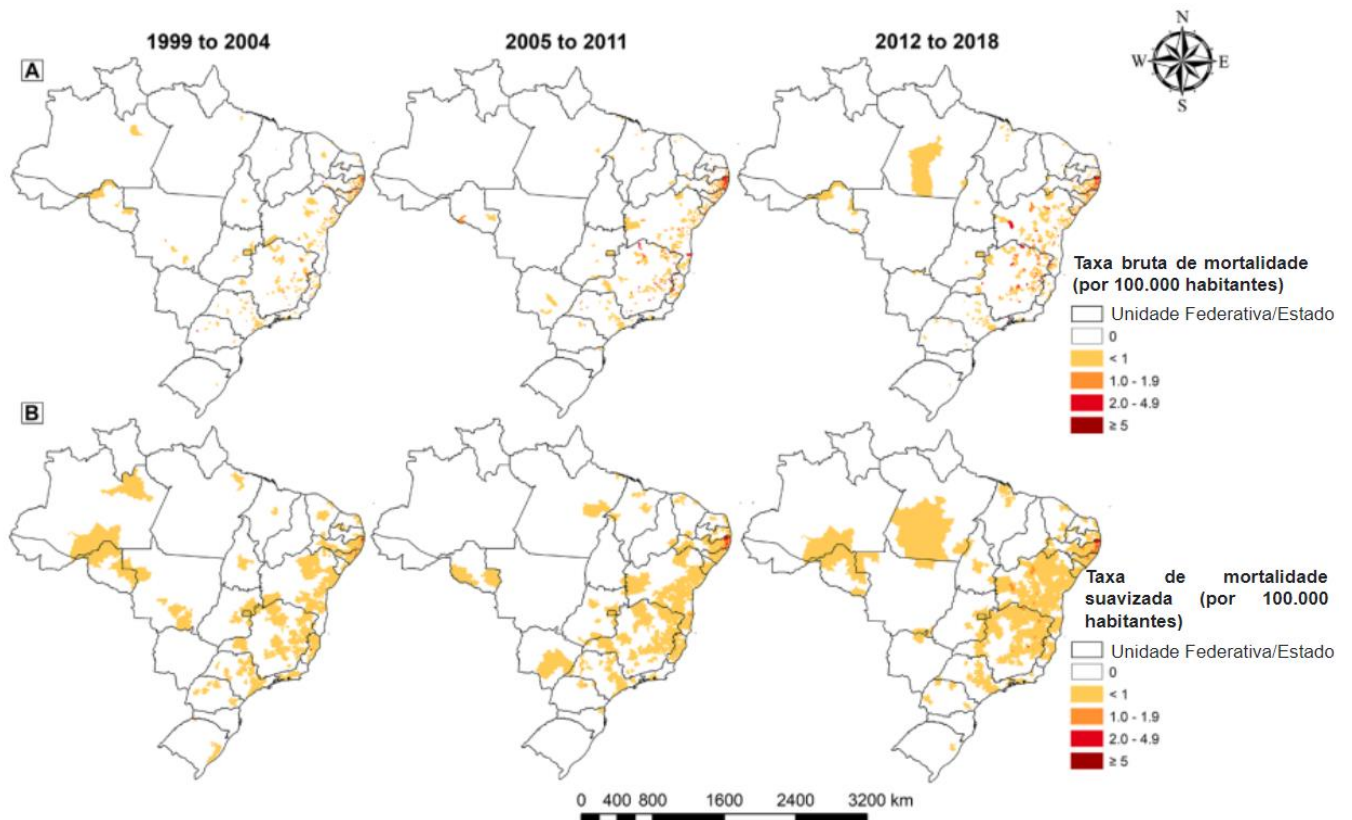


Figura 2: Distribuição espacial da mortalidade por esquistossomose no Brasil, em três períodos. (A) Distribuição espacial da taxa de mortalidade por esquistossomose. (B) Taxa de mortalidade suavizada pelo método Bayesiano Empírico Local. Fonte: Adaptada de SILVA DA PAZ et al., 2021.

Pernambuco representa um dos estados brasileiros com maior prevalência de esquistossomose, sobretudo na Zona da Mata do estado, pois esta possui características favoráveis para o desenvolvimento do ciclo do parasita, com uma área de solo fértil, com rios e poucas secas (GOMES *et al.*, 2022). Com o tempo, o perfil epidemiológico da esquistossomose apresentou novas configurações no estado, passando a ocorrer de forma aguda em surtos alocados na zona do litoral pernambucano. Em 2015, o estado deteve uma positividade média de 3%, com cerca de 180 óbitos por ano, entre 2005 e 2014, representando assim uma taxa de mortalidade cinco vezes maior que a do país (BRITO *et al.*, 2020).

Em 2016, a esquistossomose foi considerada endêmica em 103 de 185 municípios do estado pernambucano, com maior constância na Zona da Mata e na Região Metropolitana do Recife. No período de 2008 a 2014, foram constatadas no estado 473 hospitalizações pela doença, representando uma das maiores taxas de internações e de mortalidade pela doença no Brasil, nos períodos citados (DUBEUX

et al., 2019). Um fato que merece destaque no estado de Pernambuco, diz respeito ao turismo de risco. Foi evidenciado que o êxodo de portadores de esquistossomose para áreas turísticas, urbanas ou rurais, em busca de trabalho, está permitindo a viabilização do ciclo de transmissão em outras localidades (BRITO et al., 2020).

Um exemplo claro é Porto de Galinhas, situada no município de Ipojuca, que devido ao turismo, teve a orla reconfigurada, com uma nova sistemática de ocupação social. Assim, os hotéis e pousadas na área central fez com que os espaços adjacentes fossem ocupados por pessoas em situação de vulnerabilidade social. Essas áreas mais periféricas possuem um déficit de infraestrutura e saneamento básico, elevando o risco de infecção, uma vez que, indivíduos infectados começaram a residir em locais próximos a focos de hospedeiros intermediários (GOMES et al., 2022). Situação que piora nas estações chuvosas, devido a um escoamento de águas pluviais falho, onde os caramujos são carregados para ruas e quintais, elevando ainda mais o risco de infecção nessa população. A figura 3 evidencia alguns locais onde os novos criadouros se estabeleceram, colaborando para manutenção dessa parasitose no estado de Pernambuco (BARBOSA et al., 2015).

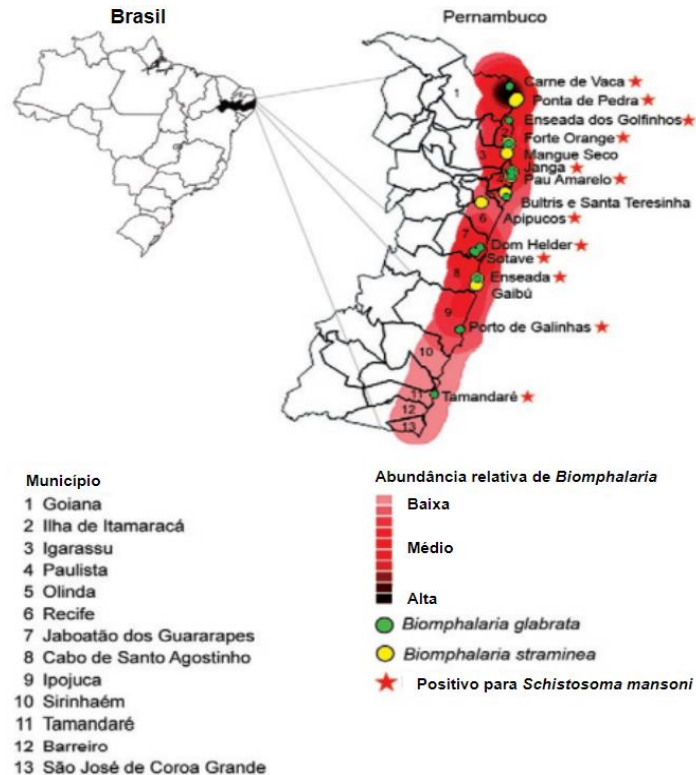


Figura 3: Mapa de criadouros e focos de esquistossomose no litoral de Pernambuco e região metropolitana do Recife resultante da expedição científica de setembro de 2008. Fonte: Adaptada de BARBOSA, et al., 2015.

2.2 BIOLOGIA E CICLO EVOLUTIVO

O ser humano é o hospedeiro definitivo do *S. mansoni* e funciona como o principal reservatório natural da infecção. Em laboratório, o camundongo é utilizado e considerado um ótimo hospedeiro em experimentos. Fazem parte do gênero *Schistosoma* os platelmintos trematódeos, dioicos e que possuem vários estágios de desenvolvimento, cada um deles com características singulares (WILSON *et al.*, 2007). O ciclo evolutivo do helminto possui fase assexuada e sexuada de reprodução, sendo do tipo heteroxênico. No ser humano, hospedeiro definitivo, o *S. mansoni* evolui para sua forma adulta, então o casal de vermes realiza a cópula, ocorrendo a fecundação da fêmea e oviposição (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

Os vermes adultos são macroscopicamente visíveis, o macho possui um corpo achatado e recurvado dorso-ventralmente, mede cerca de 1 cm de comprimento, com forma semelhante a uma folha e cor esbranquiçada, possuindo o canal ginecóforo, que serve para albergar a fêmea cilíndrica. Essa, por sua vez, mede cerca de 1,2 a 1,6 cm de comprimento e um tegumento translúcido, o que permite a visualização dos produtos da degradação como a hemozoína, conferindo a ela, a nível de microscopia ótica, uma cor mais escura que a do macho. As fêmeas fecundadas, geralmente junto ao macho, migram contra a corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na submucosa dos vasos de menor calibre da parede intestinal quando chegam no mesentério (GRYSEELS, 2012). O habitat desses vermes adultos são as vênulas do plexo hemorroidário superior e nas ramificações das veias mesentéricas, sobretudo nas inferiores (WILSON *et al.*, 2007).

No entanto, os vermes podem ser encontrados em outras localizações, como pulmões, baço, pâncreas e bexiga. Outra característica interessante é que possuem importante longevidade, em geral, de três a cinco anos, podendo chegar a 30 anos, um ganho evolutivo muito importante, em que o verme necessita ter mecanismos de evasão para todas as formas de imunidade. Um indivíduo infectado pode chegar a uma carga parasitária de 2000 vermes; o fator carga parasitária é muito importante para analisar a intensidade da infecção, que tem repercussões diretas na epidemiologia e morbidade da doença, assim como no diagnóstico (GRYSEELS, 2012). Os vermes adultos possuem o tegumento constituído por uma camada sincicial de células anucleadas, sendo recoberto por uma citomembrana heptalamelar espessa, que se renova constantemente e auxilia nos mecanismos de escape do

sistema imune. O tubo digestivo se liga ao exterior unicamente através da boca e sua excreção é realizada por células especializadas denominadas solenócitos, sua nutrição se baseia no consumo de células sanguíneas, as hemácias e os produtos que não são aproveitados são eliminados pela boca (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

Uma vez feita a postura dos ovos, podem ser lançados na corrente sanguínea e outros chegam à luz intestinal. A quantidade de ovos eliminados já foi atrelada a idade do helminto, sendo mais acentuada nas fêmeas de até dois anos, que podem pôr até 400 ovos por dia (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). Os ovos medem cerca de 100 a 150 micrômetros de comprimento por 60 micrômetros de largura, com um formato ovoide e sem presença de opérculos, porém, uma característica muito importante para diferenciá-lo de outras espécies é um espículo lateral voltado para trás. Num período entre seis a sete dias, os ovos se tornam maduros, contendo em seu interior o miracídio formado, forma usualmente encontrada nas fezes. Da submucosa os ovos chegam à luz intestinal, por meio de uma reação inflamatória que ocorre nos tecidos (NEVES, 2016).

O tempo entre a postura dos ovos até atingirem a luz intestinal é de aproximadamente 20 dias (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). Assim, os ovos vão para o exterior junto ao bolo fecal ou podem ficar retidos nos tecidos, o que está relacionado com a patogênese da doença. Ao atingirem a água, fatores como temperatura (28° C), luminosidade intensa e níveis de oxigenação da água são cruciais para que ocorra a eclosão dos miracídios (WILSON *et al.*, 2007). Os ovos do *S. mansoni* são sensíveis à água salgada e à urina, o que impede a eclosão dos miracídios. Dessa forma, condições ambientais precárias ou desfavoráveis levam a morte do miracídio, assim como a retenção dos ovos nos tecidos do corpo humano (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

Os miracídios, apresentam forma cilíndrica e variam com um tamanho de aproximadamente 180 micrômetros, apresentando células epidérmicas nas quais os cílios se implantam. Após serem liberados na água, os cílios permitem seu movimento em meio aquático e, devido às glândulas que possuem, penetram indistintamente em moluscos vetores, não vetores e outros animais, como girinos. No entanto, os miracídios são atraídos pelos moluscos através de algumas substâncias (quimiotaxia) que se difundem pela água, como a chamada miraxone, o que estimularia e atrairia os miracídios para esses hospedeiros (NEVES, 2016). Apenas os miracídios que

penetrarem nas espécies suscetíveis de *Biomphalaria* se desenvolverão. O tempo total de penetração é de 10 a 15 minutos e a capacidade de infecção é de cerca de 8 horas após a eclosão e influenciada, sobretudo, pela temperatura. Uma vez no hospedeiro intermediário, o miracídio perde seus cílios e transforma-se em esporocisto primário, esse passa por um processo de poliembrião dando origem a esporocistos secundários, que irão migrar até as glândulas digestivas. Cada esporocisto, por meio de reprodução assexuada, dará origem a numerosas cercárias, em que um único miracídio pode gerar mais de 100.000 cercárias e o *Biomphalaria glabrata* pode eliminar cerca de 600 até 4500 cercárias por dia. A fase do parasita no hospedeiro intermediário pode durar de três a cinco semanas (NELWAN, 2019).

As cercárias são formadas pelo corpo cercariano, onde estão os principais órgãos, além de uma cauda bifurcada e são liberadas através do rompimento de vesículas no tegumento do molusco. Nas horas mais quentes e luminosas do dia, chegam até a água, sobretudo de 11 às 17 horas, sendo o fator luminosidade, aparentemente, o mais importante; no entanto, a sobrevivência das cercárias na água não dura muito mais que 48 horas. No meio aquático, nadam ativamente até achar um hospedeiro definitivo, que nem sempre é o ideal, pois podem penetrar não só em humanos, mas também em outros mamíferos e aves (NEVES, 2016). Quando atingem a pele humana, fixam-se entre os folículos pilosos com auxílio de suas duas ventosas e penetram ativamente na pele, auxiliadas pelo próprio movimento e por ação de secreções histolíticas que provêm das glândulas de penetração; essa penetração leva um tempo aproximado de 15 minutos, gerando uma irritação local (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

No entanto, as cercárias também podem penetrar através das mucosas. Quando ingeridas com água, chegam ao estômago e são destruídas pelo suco gástrico, mas aquelas que conseguem penetrar na mucosa bucal desenvolvem-se normalmente. Após a penetração, perdem a cauda bifurcada e passam a ser chamadas de esquistossômulos, que por sua vez irão se adaptar às condições fisiológicas do meio interno e migram pelo tecido subcutâneo até conseguirem penetrar um vaso (NEVES, 2016). A partir disso, são levados passivamente até o coração direito, pulmões, veias pulmonares, coração esquerdo, sistema porta, veias mesentéricas, até enfim chegarem aos vasos sanguíneos das alças intestinais do sigmoide e do reto, processo que dura cerca de 24 horas. O caminho percorrido ocorre

principalmente pelo sistema vascular sanguíneo, apesar de também ocorrer mais raramente por via linfática (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

Os esquistossômulos se dirigem para o sistema porta intra-hepático, seja por via sanguínea ou por via transtissular, uma vez lá, alimentam-se e desenvolvem-se para formas unissexuadas, machos e fêmeas, cerca de 30 dias após a penetração. Os vermes adultos então migram, acasalados, via sistema porta, até os vasos mesentéricos inferiores, onde ocorrerá a oviposição. Após cerca de 45 dias da infecção do hospedeiro, os ovos podem ser evidenciados nas fezes e podem chegar ao ambiente, finalizando ou reiniciando, assim, o ciclo evolutivo do helminto (Figura 4) (MCMANUS, *et al.*, 2018). Como exposto, após a penetração das cercárias na pele humana, é necessário de 5 a 7 semanas até as formas adultas produzirem ovos, esse intervalo de tempo é conhecido como período pré patente, quando a infecção está em curso, mas a liberação de ovos ainda não pode ser detectada (NEVES, 2016). Dessa forma, a compreensão do ciclo de vida do *S. mansoni* e a movimentação do parasita entre hospedeiros intermediários e definitivos é de suma importância para o controle, tratamento e diagnóstico da esquistossomose humana (COLLEY *et al.*, 2014).

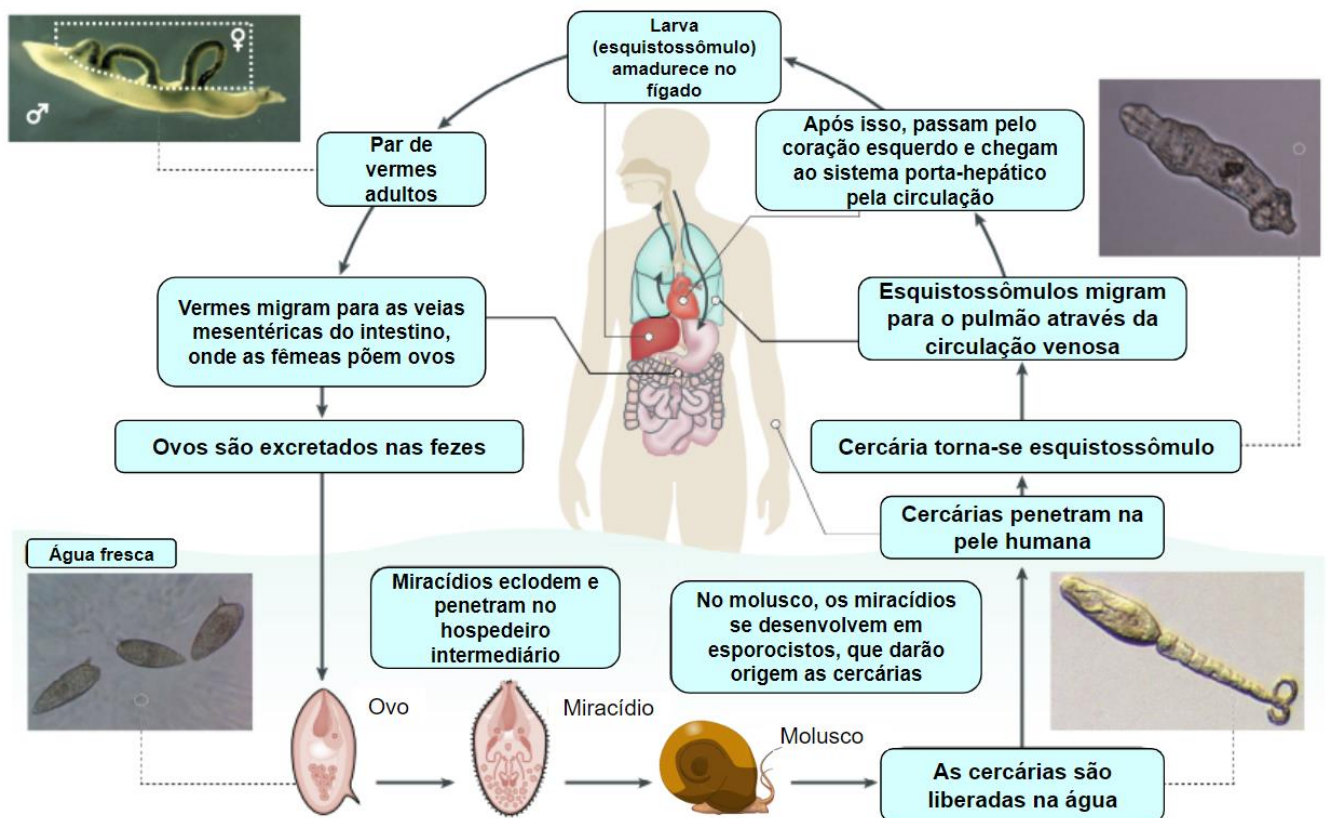


Figura 4: Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de MCMANUS *et al.*, 2018.

2.3 FISIOPATOLOGIA

A variação das formas clínicas da esquistossomose deriva-se de elementos ligados ao parasita, como: cepa, fase evolutiva; fatores do indivíduo: idade, estado nutricional, genética, resposta imune; como também, carga parasitária. Pode apresentar forma assintomática e sintomática, desenvolvendo-se em duas fases, aguda e crônica, a depender da fase evolutiva do parasita no hospedeiro (ELBAZ; ESMAT, 2013). A fase aguda da esquistossomose se inicia logo após o contato das cercárias com a pele humana, resultando em um quadro conhecido como dermatite cercariana, apresentando-se como manifestações pruriginosas na pele, urticantes, de duração geralmente transitória que cede quase sempre espontaneamente. O mecanismo pelo qual isso ocorre é dado pela morte de algumas cercárias que penetram na pele pelo sistema imune inato, assim, é formada na região uma erupção micropapular eritematosa e edemaciada, com urticária local que geralmente dura algumas horas, mas às vezes persiste por dias (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). Essa sintomatologia também é conhecida como dermatite ou coceira dos nadadores, sendo vista principalmente após infecções primárias, especialmente em turistas e migrantes, enquanto nas localidades endêmicas, estes fenômenos são pouco evidenciados (GRYSEELS, 2012).

Em seguida, ocorre um período de incubação, no qual há o desenvolvimento e liberação dos esquistossômulos na corrente sanguínea. Semanas depois, essa migração pela corrente sanguínea pode causar uma reação de hipersensibilidade sistêmica, gerando no ser humano, um quadro semelhante a gripe acompanhado de muita febre. Este pode durar até 60 dias, coincidindo com a postura de ovos, fase postural (GRYSEELS, 2012). A sintomatologia cursa inicialmente como uma gripe, mas pode piorar levando a um quadro com febre elevada acompanhada de calafrios e significativa sudorese, mal-estar geral, astenia, tosse seca, anorexia, náuseas e vômitos acompanhados de mialgias e cefaleia; em alguns casos podem ocorrer fortes diarreias (LAMBERTUCCI, 1993). Indivíduos de áreas endêmicas muitas vezes não manifestam essa sintomatologia aguda, isso provavelmente está atrelado a uma estimulação intra uterina das respostas de linfócitos T e B de bebês nascidos de mães com infecções helmínticas (COLLEY *et al.*, 2014).

Nessa fase, pode-se evidenciar durante os exames físicos, quadros de emagrecimento e desidratação, acompanhados de hepatoesplenomegalia,

microadenomegalia, taquicardia e hipotensão arterial sistêmica. Ainda durante a fase aguda, inclusive de forma simultânea à febre de Katayama, pode ocorrer uma intensa disseminação dos ovos, gerando várias áreas de necrose, sobretudo no intestino, podendo ocasionar enterocolite aguda, juntamente com a formação de granulomas em diversos órgãos, principalmente fígado, cujo quadro é conhecido como a forma aguda toxêmica, que pode resultar no óbito do indivíduo (NEVES, 2016). No entanto, a fase aguda da doença nem sempre possui manifestações intensas, variando de acordo com a quantidade de cercárias que conseguiram penetrar e a reatividade do hospedeiro, durando, na maioria das pessoas, entre quatro e oito semanas e ao passar cerca de quatro meses evoluem para fase crônica (LAMBERTUCCI, 1993).

A fase crônica da doença pode se apresentar de maneira polimórfica, apresentando diversas variações clínicas, com maior destaque para formas digestivas; no entanto, também pode haver presença de distúrbios vasculares pulmonares, formas pseudoneoplásicas, além da nefropatia esquistossomótica e das lesões ectópicas. Das formas digestivas, a intestinal e a hepatointestinal, que vêm acompanhadas de hepatomegalia, são consideradas mais leves, sendo geralmente tidas em conjunto, com maior ocorrência em jovens (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). Essas formas estão associadas à passagem ou retenção de ovos do parasita nos tecidos intestinais, o que induz inflamação granulomatosa da mucosa, com microulcerações e sangramento superficial (NEVES, 2016). A sintomatologia geral dessas formas cursa com eructações, sensação de plenitude gástrica, náuseas, vômitos, pirose, flatulência e anorexia, associados à dor abdominal do tipo cólica, difusa ou localizada, geralmente acompanhada de diarreias (MCMANUS *et al.*, 2018).

A forma hepatoesplênica é a evolução da forma intestinal ou hepatointestinal, com exacerbação dos sintomas e danos hepáticos e também pancreáticos. O desenvolvimento dessa forma está relacionado com inúmeros fatores, desde da etnia, carga parasitária, estado imunológico do ser humano, infecções secundárias, uso do álcool ou outras drogas, entre outros determinantes (LAMBERTUCCI, 1993). O desenvolvimento dessa forma ocorre quando o fluxo sanguíneo venoso carrega os ovos das veias mesentéricas para os pequenos ramos portais do fígado, através da veia porta, onde ficam retidos nos tecidos periportais pré-sinusoidais (MCMANUS *et al.*, 2018). Uma vez retidos, são formados os granulomas, e a depender do grau de intensidade, gera um aumento substancial do baço e do fígado, especialmente o lobo

hepático esquerdo, característico da esquistossomose hepatoesplênica (NEVES, 2016).

A forma hepatoesplênica pode ser dividida ainda numa forma compensada e descompensada. A forma compensada cursa com os sintomas digestivos das formas anteriores e associam-se à hipertensão portal e a esplenomegalia. Devido a hipertensão na região, ocorre o extravasamento de líquido para região peritoneal, decorrentes de alterações hemodinâmicas, causando ascite, conhecida popularmente como barriga d'água e também é formada uma circulação colateral anormal, de modo a compensar a pressão local, gerando as varizes esofagianas, que podem vir a romper e causar fenômenos hemorrágicos (NEVES, 2016). Esse quadro se configura como esquistossomose hepática avançada, tendo como marca a fibrose de Symmers, caracterizada por uma retração da cápsula de Glisson, que forma saliências lobulares no tecido hepático. Na forma descompensada, além da ascite volumosa, pode-se evidenciar edema de membros inferiores, icterícia, e geralmente está associada a outros quadros de inflamação hepática (MCMANUS *et al.*, 2018).

Não muito evidenciadas, porém, podem ocorrer alterações pulmonares. Clinicamente, podem ser classificadas em forma hipertensiva e cianótica. A hipertensiva, mais comum, tem como sintomatologia a dispneia de esforço, palpitações, tosse seca e dor torácica constritiva. Alterações cardíacas também são observadas e, caso não controladas, o paciente pode desenvolver o *cor pulmonale* (aumento do ventrículo direito do coração). Já a forma cianótica, possui um prognóstico mais complexo e é marcada por cianose acompanhada de microfístulas arteriovenosas (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). Outra forma rara da esquistossomose é a pseudoneoplásica, que pode simular um adenocarcinoma de cólon, o que gera confusão no diagnóstico da patologia (MCMANUS *et al.*, 2018). Outro quadro que pode ocorrer é a nefropatia esquistossomótica, que é mais visualizada durante a forma hepatoesplênica. Seu mecanismo etiopatogênico, ao contrário das demais formas, não está relacionado com os granulomas, mas sim por uma reação imunológica, que gera imunocomplexos que acabam sendo depositados nos glomérulos, gerando danos ao tecido renal (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

Além disso, podem ocorrer formas ectópicas da doença, que são ocasionadas pela presença de alguma forma do parasita, fora do sistema porta hepático, como no pâncreas, miocárdio, na região gástrica e até mesmo no sistema nervoso (NEVES, 2016). Dentre essas formas, destaca-se a neuroesquistossomose. Tendo como

principal manifestação a mielorradiculopatia esquistossomótica, que é uma forma bastante grave, causada pela resposta inflamatória ao redor dos ovos no plexo venoso cerebral ou espinhal. Os ovos podem chegar ao sistema nervoso por meio de alguns mecanismos que ainda estão sendo estudados, porém, acredita-se que possa ocorrer a embolização dos mesmos através das anastomoses arteriovenosas e também a oviposição no local, visto que os vermes adultos podem migrar de maneira anômala até esse sítio (VIDAL *et al.*, 2010). A sintomatologia depende da localização dos ovos, porém, os quadros mais comuns comprometem a medula espinhal com possível evolução para uma mielite transversa; outras manifestações clínicas comuns são dores na região lombar, alteração da força dos membros inferiores e distúrbios urinários (MCMANUS *et al.*, 2018).

Dessa maneira, o conhecimento acerca das formas de apresentação clínica da esquistossomose é de suma importância para a condução médica e laboratorial. Na área das análises clínicas, a forma da manifestação da esquistossomose é decisiva para o diagnóstico correto. Grande parte das análises pode ser feita com a correlação da clínica e a partir de exames parasitológicos de fezes, como o Hoffman ou Kato Katz. No entanto, mesmo nas formas digestivas ou em formas em que não é possível evidenciar ovos nas fezes, como também em indivíduos com uma carga parasitária baixa encontrados em regiões de baixa endemicidade, métodos de diagnósticos alternativos, tal como ELISA, fazem-se necessários para um melhor delineamento da infecção.

2.4 IMUNOPATOGENESE / IMUNOLOGIA

Como abordado anteriormente, é notório que a patogênese da esquistossomose depende da interação parasita-hospedeiro humano. Dentre os diversos fatores dessa relação, a fase evolutiva, cepa, número de parasitas e os mecanismos de escape destacam-se ao lado do *S. mansoni*, favorecendo o estabelecimento da infecção. Em relação ao do ser humano, a carga parasitária que possui, fatores genéticos, órgãos lesados são alguns fatores de muita importância; no entanto, o elemento que parece ser mais determinante nessa relação, ao que tudo indica, está no perfil imune do hospedeiro humano antes, durante e após a infecção (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

O *S. mansoni* é um parasita altamente adaptado ao ser humano e durante sua evolução adquiriu importantes mecanismos de escape para sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado. O parasita em questão tem a capacidade de anexar antígenos do seu hospedeiro na sua membrana plasmática, mecanismo que dificulta seu reconhecimento pelas células do sistema imunológico como algo não próprio, mas também pode desprender partes de seu tegumento e substituí-las por novas camadas. Além disso, possui algumas proteases e outras enzimas que podem ser liberadas e, assim, destruir algumas imunoglobulinas importantes, como também impedir a ação de proteínas do sistema complemento (BOROS; WHITFIELD, 1999).

Além desses mecanismos de escape, o parasita também passa por mudanças morfológicas dentro do hospedeiro e cada etapa dessa ativa diversos componentes imunes do organismo. A primeira forma evolutiva a entrar em contato com o hospedeiro humano é a cercaria e após aproximadamente 12 horas após sua penetração, já se pode observar uma intensa reação inflamatória dérmica e subdérmica, caracterizando a dermatite cercariana (LICHTENBERGOVÁ *et al.*, 2008). Essa é a primeira linha de defesa contra a infecção, sendo capaz de destruir boa parte das cercárias que penetram na pele e alguns esquistossômulos. Essa primeira resposta do organismo é constituída sobretudo de células da resposta imune inata, como mononucleares e polimorfonucleares (STADECKER, 1999).

Essa reação de hipersensibilidade imediata ocorre por ativação do sistema inato, sendo assim, em poucas horas há um infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans. Além disso, é possível evidenciar a liberação de quimiocinas e de algumas citocinas como IL-1b, IL-6, IL-12p40, entre outras. Passada esta fase inicial, que dura aproximadamente cinco dias, a resposta imune adaptativa começa a se estabelecer, ocorrendo o influxo de células TCD4+, que aumenta a produção de algumas das citocinas citadas e produz novas como IFN- γ e IL-4, que ao passar de duas semanas vão reduzindo (HOGG *et al.*, 2003).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na fase aguda não são os mais estudados e, por conta desse fato, ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que a resposta predominante durante essa fase, é do tipo Th1, que só é substituída por uma resposta Th2 na fase postural (Figura 5). Ainda assim, a partir de modelos murinos, se evidenciou durante a fase pré-patente, a produção de TNF e IL-2 e IL-6, sendo sua maior parte produzida por células mononucleares (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011). A resposta imune do tipo Th1 é, provavelmente, a responsável

pelas lesões teciduais e principais manifestações da fase aguda da doença. Além disso, também ocorre o processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), que possui eficiência sobre os esquistossômulos, porém, esse mecanismo parece ser ineficaz em vermes adultos (PEARCE; MACDONALD, 2002).

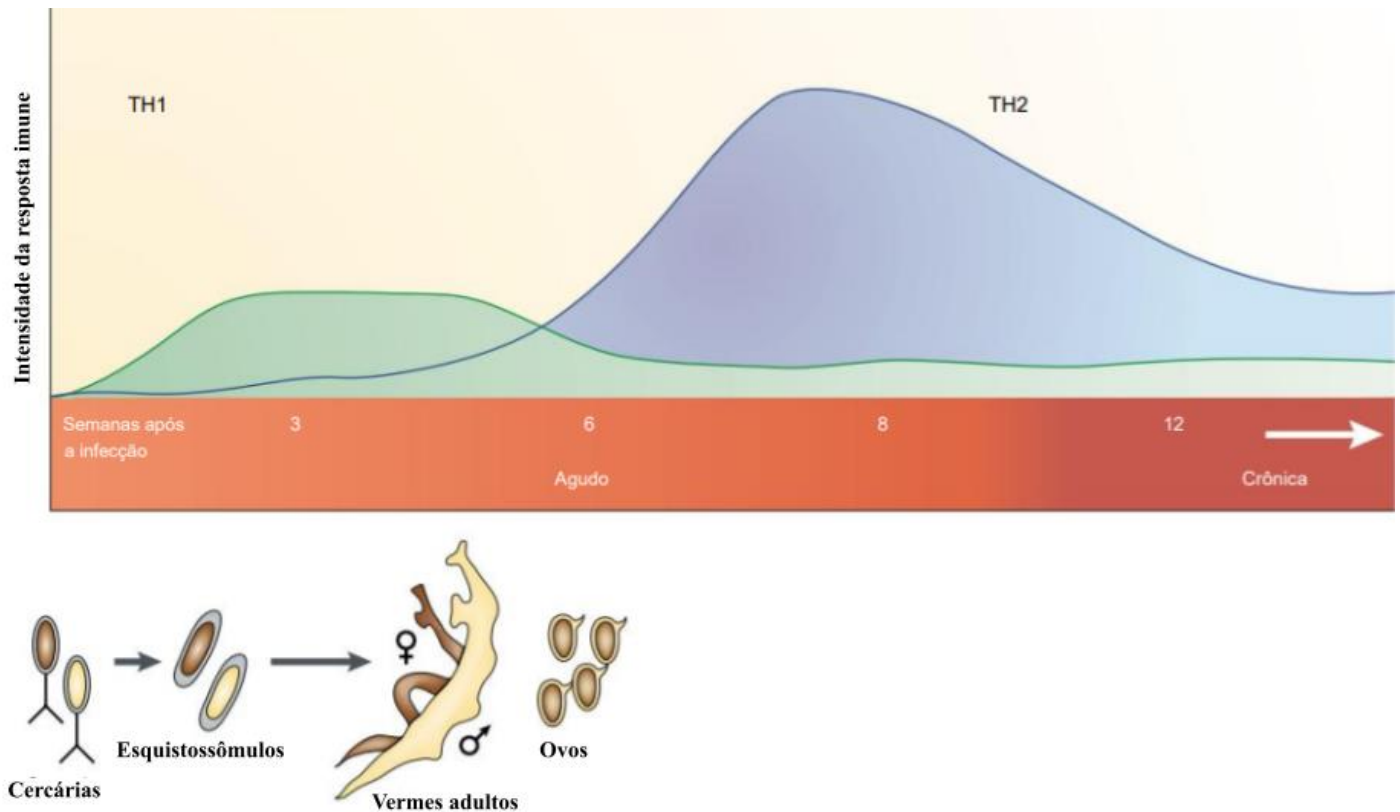


Figura 5: Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção ocasionada pelo *S. mansoni*.
Fonte: Adaptada de PEARCE; MACDONALD, 2002.

Ao iniciar a fase postural, alguns antígenos são secretados e podem atravessar as membranas do ovo; dessa forma, estimulam a resposta imune, principalmente celular, levando a uma reação granulomatosa significativa (MATOSO, 2012). A resposta a esses antígenos se inicia, principalmente, nos linfonodos mesentéricos, levando a ativação de células TCD4+. Essa ativação se dá por meio de MHC de classe II, por meio das células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas locais, resultando em uma resposta inicial Th1, culminando nos granulomas agudos. Esse mecanismo se retroalimenta por um tempo, em que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF, óxido nítrico e IL-12 estimulam as células Th1, com consequente produção de IFN- γ e IL-2 atraindo mais APCs e células T para o local (PEARCE *et al.*, 1991).

No entanto, a resposta Th1 na esquistossomose é de curta duração, uma vez que os antígenos derivados do ovo induzem uma resposta Th2. Dessa maneira, novas citocinas passam a ser liberadas, citocinas em sua maioria anti-inflamatórias, principalmente a IL-4, IL-5 e IL-13. Essa resposta se intensifica por volta da sétima ou oitava semana, estimulando células do tipo B com posterior produção de anticorpos. Nessa fase, os eosinófilos são recrutados com mais intensidade, sendo esses potentes produtores de IL-4, atraindo mais APCs, sobretudo macrófagos, promovendo mudanças significativas na resposta imune do hospedeiro (RUMBLEY *et al.*, 1999). Para o hospedeiro humano, sustentar um ambiente Th2 parece ter um efeito protetor; no entanto, leva a quadros de fibrose com repercussões clínicas sérias, enquanto uma resposta Th1 muito acentuada induz mais lesões teciduais, sobretudo hepáticas. Uma citocina muito importante a se destacar para esse equilíbrio é a IL-10, que consegue regular negativamente a resposta das células T, assim consegue reduzir uma resposta muito acentuada tanto Th1 e Th2 (STADECKER, 1999).

Em relação à formação dos granulomas, evento esse de maior destaque na patologia esquistossomótica, podem encontrar-se de forma isolada ou difusa pelo tecido hepático e partes do intestino, onde vários mecanismos ocorrem para sua formação (NEVES, 2016). A resposta granulomatosa é mediada por populações de linfócitos TCD4+, os quais induzem uma atividade fibrótica em torno dos ovos que ficaram retidos no tecido. Os antígenos liberados dos ovos, como já mencionado anteriormente, induzem uma resposta Th1 inicialmente de duração curta e, posteriormente, uma resposta Th2, havendo nesse processo um influxo de macrófagos, eosinófilos e alguns plasmócitos para o local, além de células TCD8. As células citadas, principalmente os macrófagos, se projetam ao redor do ovo e transformam-se em fibroblastos, tomando uma organização em camadas de forma concêntrica, lamelar, com grande produção de colágeno, caracterizando um granuloma maduro (Figura 6) (CARLOS DE SOUZA *et al.*, 2011).

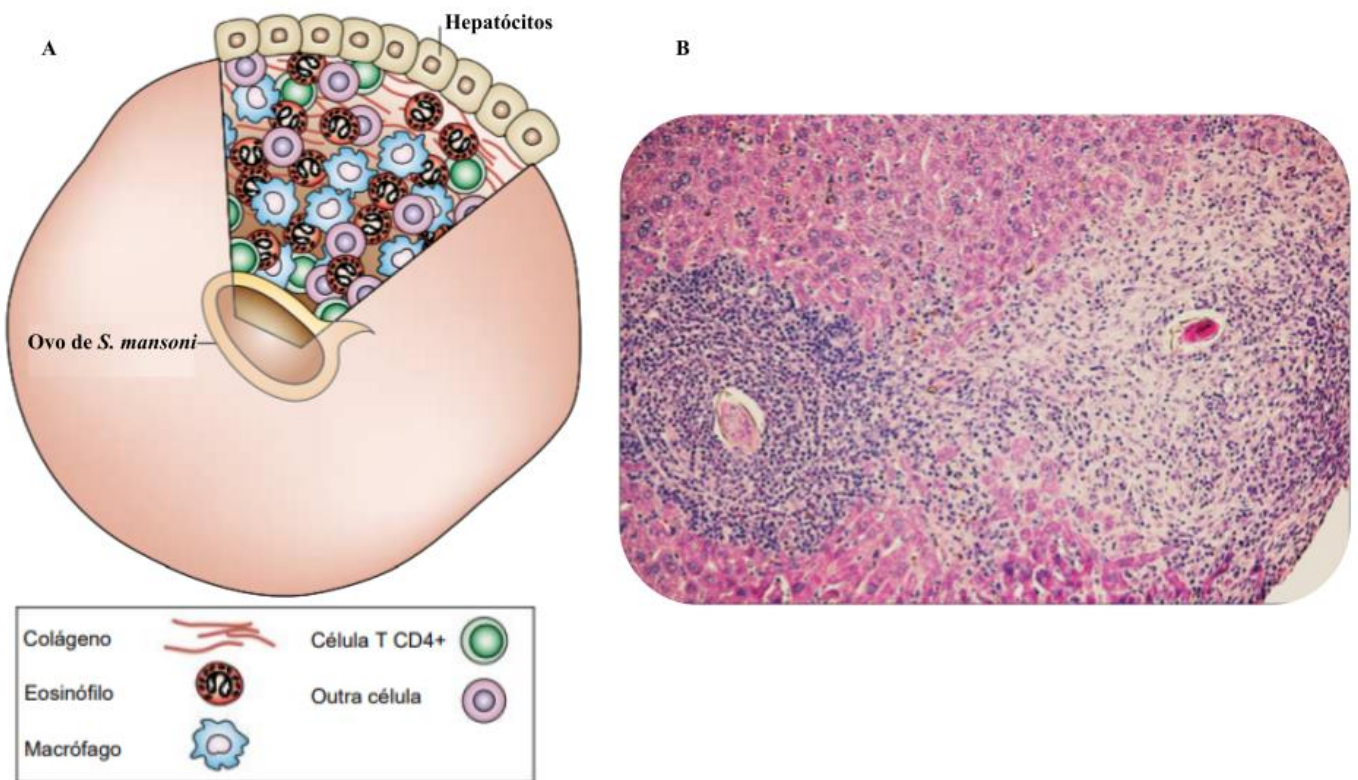


Figura 6: A) Desenho esquemático da formação do granuloma, destacando células e componentes essenciais para seu desenvolvimento. Fonte: Adaptada de PEARCE; MACDONALD, 2002. B) Granulomas induzidos por ovos de *S. mansoni* no fígado de um rato infectado. Fonte: Adaptada de COLLEY *et al.*, 2014.

Em modelos murinos, foi demonstrado que IL-13 é uma citocina de extrema importância para esse processo (PEARCE; MACDONALD, 2002); nos seres humanos, a regulação da fibrose envolve diversos mediadores. Indivíduos com quadros graves de fibrose apresentavam níveis mais altos de TNF, IL-5 e IL-13, assim, as citocinas produzidas durante a resposta Th2, com destaque para IL-13 representam papéis cruciais para o desenvolvimento do granuloma (WILSON *et al.*, 2007). Os granulomas passam por etapas de desenvolvimento no hospedeiro humano, ocorrendo primeiramente uma fase necrótica-exsudativa, resultando numa área necrosada ao redor do ovo, área esta que é circundada por populações de eosinófilos, neutrófilos e histiócitos, com intensa deposição de material eosinofílico, conhecido como fenômeno de Hoeppli. Posteriormente, há uma fase produtiva, também chamada de reação histiocitária, que tem como característica o início do reparo da área afetada. A fase final é justamente a cura ou fibrose, em que o granuloma endurecido poderá sofrer processos de calcificação ou absorção,

resultando no seu posterior desaparecimento e também nas repercussões clínicas do paciente infectado (NEVES, 2016).

Apesar disso, a formação dos granulomas pode ter um papel primordial na proteção do hospedeiro vertebrado. Foi evidenciado que camundongos anteriormente tolerados com antígenos do ovo do *S. mansoni*, não desenvolveram o granuloma durante o decorrer da infecção, mas os animais apresentaram graves lesões hepatotóxicas, com intenso acúmulo de lipídeos nos hepatócitos. Isso provavelmente ocorre por meio das toxinas liberadas pelo ovo, que durante a resposta granulomatosa são sequestradas; além disso, anticorpos durante a formação do granuloma podem atuar neutralizando as hepatotoxinas, impedindo esse evento de lesão tóxica no fígado (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Com o passar do tempo, a resposta Th2 é modulada, sobretudo pelas células T regulatórias que produzem IL-10, citocina associada à regulação das respostas imunes, diminuindo a inflamação ao redor dos ovos (WILSON *et al.*, 2007). Além da resposta celular, a imunidade humoral também se relaciona com a proteção na esquistossomose. A depender do isotipo de anticorpo produzido, podem desempenhar funções diferentes na resposta imune contra o *S. mansoni*, podendo ser uma atividade regulatória ou efetora. Foi demonstrado que os isotipos IgG1, IgG3 e IgE são capazes de induzir a destruição de esquistossômulos *in vitro*, por meio do mecanismo de ADCC e via sistema complemento, envolvendo também a presença de eosinófilos e macrófagos. Em contrapartida, a IgM, IgG2 e IgG4 não possuem a capacidade de induzir a destruição do *S. mansoni* (MATOSO, 2012).

Além disso, a produção de imunoglobulinas também varia de acordo com a fase da doença. Alguns estudos apontaram que indivíduos na fase aguda possuem níveis elevados das subunidades IgG1, IgG2 e IgG3, e em menores níveis a IgG4 e IgM; em contrapartida, na fase crônica, ocorre uma baixa produção dos subtipos de IgG, com exceção da IgG4, que se mostra elevada e atuante contra vermes adultos nessa fase (JASSIM *et al.*, 1987). No entanto, segundo Defranco, Locksley e Robertson (2007), as imunoglobulinas da classe IgM são produzidas em maior quantidade na fase aguda da doença contra os antígenos dos esquistossômulos e ao final da resposta aguda, ou seja, Th1, ocorrendo a mudança do isotipo para IgG.

A resistência e as respostas imunes que exercem efeitos de proteção para o hospedeiro se desenvolvem em aproximadamente 10 anos, fato esse que pode explicar porque crianças são mais suscetíveis à reinfecção pós-tratamento que

adultos (MCMANUS *et al.*, 2018). A resistência a reinfecções foi atrelada a uma resposta Th2, com eosinofilia, produção de IgE específica para os vermes e aumento de citocinas IL-4 e IL-5; em contrapartida, a IgG4 específica, que é um anticorpo bloqueador, atua competindo com epitopos similares aos da IgE, interferindo assim no seu papel, sendo relacionada com a susceptibilidade à infecção (COLLEY *et al.*, 2014).

Uma das explicações para esse evento é que a morte dos vermes adultos resulta na liberação de alguns antígenos que podem reagir de forma cruzada com outros antígenos larvais, induzindo, assim, respostas protetoras, com elevada produção de IgE. Desse modo, quanto mais vermes mortos um indivíduo possui ou possuiu durante a vida, mais forte será sua resposta protetora (KABATEREINE *et al.*, 1999). Como os vermes possuem uma grande longevidade, pode-se entender que as crianças, que ainda não possuem tantos vermes mortos, são mais suscetíveis, sendo o inverso verdadeiro, uma vez que adultos acumulam mais vermes mortos durante a vida; dessa forma, a imunidade protetora necessita de anos para se desenvolver de forma plena (FITZSIMMONS *et al.*, 2012).

A relação IgE/IgG4 ganha destaque para entender a dinâmica de algumas áreas endêmicas e as possíveis falhas de diagnóstico. No Brasil, alguns indivíduos de áreas endêmicas apresentam exames de fezes negativos, mesmo exercendo atividades de risco, ou seja, que estão em contato rotineiro com águas contaminadas com cercárias (MCMANUS *et al.*, 2018). Além do balanço favorável ao IgE que possuem, evidenciou-se altos níveis de interferon gama, citocina comum em resposta Th1. Com essa atividade protetora em evidência, o indivíduo raramente vai apresentar uma carga parasitária alta, o que ocasiona diversas falhas nos métodos convencionais de análise de fezes, sendo necessário a complementação com outras metodologias (NEVES, 2016).

O entendimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na esquistossomose é essencial para compreender a fisiopatologia da doença, assim como avaliar condutas para diagnóstico, tratamento e uma futura vacina. Para métodos de diagnósticos sorológicos, principalmente, entender as fases de cada resposta imune, assim como as citocinas e imunoglobulinas envolvidas em cada uma delas é imprescindível para executar um diagnóstico imunológico mais preciso, para, assim, auxiliar nas etapas posteriores de inquéritos e tratamento da população afetada pela esquistossomose.

2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A esquistossomose é uma doença negligenciada e está relacionada às áreas mais pobres, representando um sério transtorno para a rede pública de saúde. Há uma variedade de formas de diagnósticos para esquistossomose, que se diversificam desde uma análise microscópica até abordagens moleculares mais aprimoradas (CAI *et al.*, 2019). O método recomendado pela OMS, o Kato-Katz, se baseia na detecção microscópica dos ovos do *S. mansoni*, sobretudo, é recomendado durante a infecção ativa e após o período pré-patente da doença. Porém, sua sensibilidade é drasticamente afetada em infecções que possuem uma carga parasitária muito baixa, fato que traz à tona a discussão se o mesmo ainda deve ser usado de forma isolada como padrão ouro (SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

Por mais que o Kato-Katz seja uma opção muito boa e acessível para áreas de baixa renda, nem sempre seus resultados são condizentes com a realidade e não possui uma eficiência adequada para determinar a prevalência da doença nesses casos, assim, como funciona para médias e altas cargas parasitárias. Além disso, existem formas clínicas da doença cujos ovos não podem ser detectados nas fezes, o que impede o diagnóstico por esse método (MCMANUS, 2018). Os índices de baixas cargas parasitárias são mais evidentes nos indivíduos de áreas endêmicas, fato resultante de rodadas consecutivas de tratamento e exposição frequente ao parasita. Outras ocasiões que podem resultar na baixa carga parasitária ocorrem em indivíduos sujeitos a uma única exposição, como ocorre no turismo de pessoas para áreas de transmissão, além do deslocamento de residentes de áreas endêmicas para os grandes centros urbanos (SIQUEIRA *et al.*, 2015). A falha no diagnóstico desses indivíduos possui diversas repercussões a curto e longo prazo, que além de não receberem o tratamento adequado e no tempo viável, podem contribuir para manutenção, transmissão e estabelecimento da doença em novas áreas (ENK *et al.*, 2008).

Outros métodos de diagnóstico mais sensíveis para infecções ativas vêm sendo desenvolvidos com propósito de suprir as falhas do método convencional, além de melhorias e adequações na metodologia do Kato-Katz, como o aumento do número de amostras colhidas e de lâminas que são avaliadas. Assim, testes rápidos também foram desenvolvidos para diagnóstico da esquistossomose, testes esses baseado na detecção de antígenos secretados pelo parasita na urina (MCMANUS, 2018). O teste

de antígeno catódico circulante (POC-CCA) foi comercialmente distribuído a partir de 2008 e, por conta de seus bons resultados, sobretudo, sua sensibilidade vem sendo cada vez mais aprimorada, sendo estudado como um possível substituto para o Kato-Katz, principalmente para estimar a prevalência (KITUR *et al.*, 2016).

No entanto, grande parte dos estudos avaliativos desse método foram realizados no continente africano e utilizando o Kato-Katz como método de referência, fato esse que pode gerar dúvidas sobre sua utilização em áreas de baixa endemicidade. Outros métodos que se destacam, sobretudo nos últimos anos, são aqueles baseados em técnicas moleculares, esses vêm sendo úteis como uma ferramenta complementar aos métodos parasitológicos para detecção de baixas cargas parasitárias, como também na avaliação da cura pós-tratamento (SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

Das técnicas moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se destaca. Capaz de detectar o DNA do parasita em diversas amostras, tem apresentado uma sensibilidade melhor que métodos parasitológicos convencionais. Porém, possui um custo mais elevado de equipamentos e reagentes e tem sido mais empregada em ambientes com muitos recursos, uma vez que necessita de uma estrutura mais elaborada, limitando seu uso em diversos locais, sobretudo nas áreas que possuem uma vulnerabilidade social maior, locais onde a parasitose é mais presente no Brasil (MEURS *et al.*, 2015). A detecção de DNA do parasita baseada em PCR pode utilizar amostras de fezes e urina, e até mesmo lavado vaginal e líquido cefalorraquidiano para diagnóstico de esquistossomose urogenital ou neuroesquistossomose, por exemplo (MCMANUS, 2018). Outro aspecto de destaque da técnica é a possibilidade de usá-la de forma mais abrangente, chamada PCR multiplex, que pode detectar inúmeras parasitoses intestinais em uma única amostra, o que se configura vantajoso, sobretudo para turistas e viajantes; no entanto, seu custo é ainda mais elevado, pois demanda uma maior quantidade de reagentes para sua realização (CNOPS *et al.*, 2012).

Assim, métodos imunológicos, surgem como uma boa alternativa, com menor custo para diagnóstico da esquistossomose. Tais métodos são, em sua maioria, baseados em reações antígeno-anticorpo, detectadas através da mudança de cor, que ocorre utilizando um conjugado ligado a enzima e o substrato enzimático. Esses testes identificam a presença e concentração de moléculas em fluidos biológicos, sendo o de maior destaque o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que vem

tendo sua metodologia melhorada ao longo do tempo (AYDIN, 2015). O ELISA já se mostrou mais sensível que métodos parasitológicos costumeiramente utilizados. Além disso, pode ser realizado de forma multi-isotópica, detectando mais de uma classe e subclasses de anticorpos, podendo diagnosticar a doença desde a fase aguda pré-patente até a fase crônica, o que melhora sua eficiência e utilização (SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

As análises baseadas na detecção de antígenos ou anticorpos possuem características diferentes em certos ambientes. Indivíduos de áreas endêmicas produzem anticorpos por frequentes exposições ao parasita; no entanto, não significa que os mesmos estejam infectados, já residentes que foram previamente infectados podem manter os anticorpos circulantes por um longo período pós-tratamento, variando de meses até anos (DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004). Pode-se separar os imunoenaios em dois tipos, sendo esses homogêneo e heterogêneo. Nos do tipo homogêneo, as enzimas tornam-se inativadas quando se ligam aos anticorpos, não ocorrendo etapas de lavagem em que se separa os antígenos do meio, sendo mais empregado na medição de substâncias em quantidades pequenas. Esse método não possui boa sensibilidade e é custoso, tendo basicamente a facilidade de manipulação como vantagem. Já nos métodos de imunoenaios enzimáticos heterogêneos, como o ELISA, utilizam algumas etapas de lavagens que são importantes para evitar a interferência de qualquer molécula no meio após a ligação do antígeno e do anticorpo, sendo usada para detectar anticorpos e antígenos específicos, o ELISA possui diversos tipos de abordagens metodológicas para melhorar sua eficácia no diagnóstico (O'KENNEDY *et al.*, 1990).

O ELISA direto foi metodologia que permitiu a otimização das demais abordagens desse ensaio, sendo está utilizada na detecção de antígenos de alto peso molecular. De modo geral no ELISA direto, a placa é revestida com o anticorpo e em seguida adicionado um antígeno marcado com uma enzima que permite a medição utilizando o substrato apropriado, resultando assim numa coloração (ENGVALL, 2010). A respeito do ELISA indireto, metodologia utilizada neste trabalho, foi elaborada em 1978 por Lindström e Wager, baseada no ELISA direto. Nesse tipo de ELISA, o soro a ser testado é adicionado aos poços já revestidos/sensibilizados com antígenos, além de já bloqueados, geralmente, com uma solução à base de proteínas, e posteriormente, as placas são incubadas. Durante essa incubação, os anticorpos do soro testado ligam-se aos antígenos na placa, formando o complexo antígeno-

anticorpo. Para visualizar este complexo, é adicionado um anticorpo secundário, também chamado de anti-anticorpo, que é marcado com a enzima. Esse anticorpo secundário liga-se ao anticorpo que se deseja analisar, no caso de um paciente positivo. Após essa etapa, o substrato da enzima e um cromógeno são adicionados ao meio e, devido a reação que ocorre, é produzida uma cor, a qual tem sua concentração determinada, geralmente por densidade óptica (Figura 7) (AYDIN, 2015).

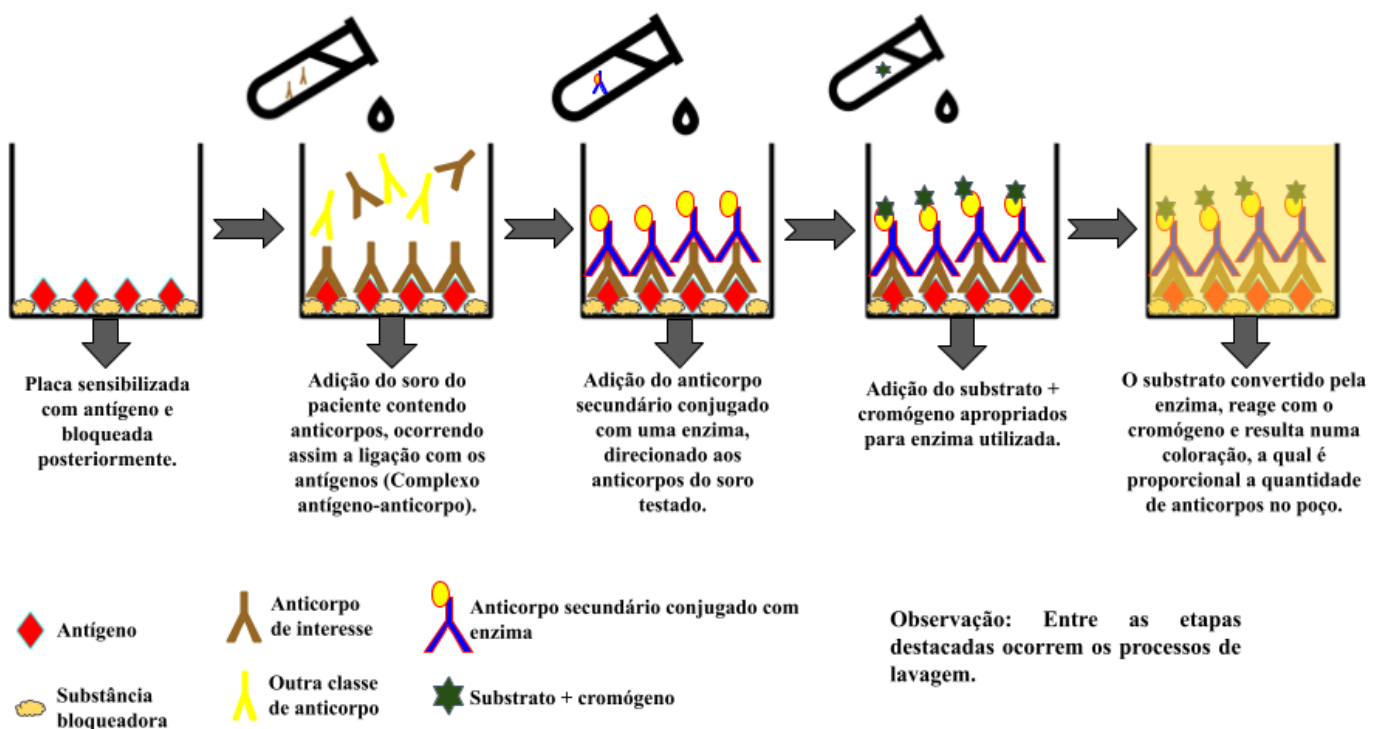


Figura 7: Desenho esquemático do método de ELISA indireto. Fonte: O autor

O ELISA, tem sua utilização prejudicada no nosso meio por uma limitação de reagentes comerciais aplicáveis ao diagnóstico; no entanto, por viabilizar a automação, e promover ensaios quantitativos, demonstra-se uma técnica apropriada para aplicação em estudos populacionais (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Ademais, é adequado nos casos de baixa carga parasitária, pois permite distinção entre indivíduos na fase aguda e crônica da doença e diagnosticar formas ectópicas da doença (CAI *et al.*, 2019). Porém, por ainda apresentar algumas limitações, o ELISA ainda não é o método de primeira escolha para o diagnóstico da esquistossomose em

áreas endêmicas; no entanto, surge como uma importante ferramenta complementar durante levantamentos epidemiológicos em áreas de baixa endemicidade, configurando um método de boa aplicabilidade no diagnóstico da parasitose, possuindo ótimas perspectivas futuras (SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

A IgG4 é um anticorpo que está relacionado à infecção da esquistossomose, indicando que o aumento da reatividade de IgG4 anti-SEA e anti-SWAP amplia o risco de infecção por este parasita, tornando os indivíduos mais suscetíveis a reinfecções. Foi demonstrado que a IgG4 anti-SEA possui um poder de predição da infecção significativo, que reduz à medida que o tempo passa após tratamento. Fato esse, que está associado com a carga parasitária (MATOSO, 2012). No entanto, a IgG4 anti-SWAP também foi correlacionada positivamente com a carga parasitária, mostrando, inclusive, que pode competir com IgE pelo mesmo sítio de ligação ao antígeno, interferindo na degranulação dos mastócitos e na proteção mediada pela IgE (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

Acerca do tratamento para esquistossomose, a principal estratégia global tem sido o tratamento em massa com praziquantel. Numa visão geral, o tratamento com essa droga tem reduzido a prevalência e a intensidade da patologia, contribuindo, assim, para uma redução de morbidade e mortalidade da doença. No entanto, sua utilização não conseguiu eliminar a esquistossomose; além disso, pacientes começaram a exibir altas taxas de reinfecção, mantendo o ciclo do parasita. Com isso, é notório que novas abordagens devem ser realizadas e destacar a importância do correto diagnóstico para o controle da esquistossomose (SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Dessa maneira, nosso estudo propõe a criação de um método com a capacidade de detectar a classe de anticorpo IgG4 anti-SWAP, visto que, a utilização desse biomarcador imunológico, pode auxiliar no monitoramento de casos de esquistossomose, em áreas endêmicas, contribuindo diretamente para seu controle.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método ELISA de detecção de IgG4 anti-SWAP em pacientes infectados com *S. mansoni* residentes em área endêmica de Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Produzir antígenos solúveis a partir dos vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni* para detectar o isótipo IgG4 em soro de pacientes com Esquistossomose mansônica;
- II. Padronizar o método de “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) para detecção de IgG4 específicas para SWAP;
- III. Correlacionar os níveis de IgG4, a carga parasitária, sexo e idade em amostras coletadas de indivíduos de área endêmica com baixa carga parasitária.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de corte transversal para validar o método de ELISA para detecção de imunoglobulinas humanas do tipo IgG4 em amostras de soro de 344 indivíduos que residem em área endêmica para infecção pelo *S. mansoni*. A obtenção das amostras utilizadas para realização desse estudo ocorreu a partir de um inquérito epidemiológico realizado em Porto de Galinhas, município de Ipojuca-PE.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo faz parte de um projeto maior (Validação de Modelos de Risco para Transmissão e Endemização da Esquistossomose: 20 anos de estudo em Porto de Galinhas - PE) que foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, sob o número CAAE: 02075118.0.0000.5190. Os procedimentos que envolvem animais de experimentação foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 123/2017.

4.3 ÁREA DE ESTUDO E LOCALIDADES

O estudo foi desenvolvido na localidade de Porto de Galinhas, no município de Ipojuca, litoral sul do estado de Pernambuco, distando cerca de 60 km do Recife - PE. O município de Ipojuca faz fronteira com os municípios de Cabo de Santo Agostinho, Escada e Sirinhaém e tem uma área territorial de 532 km², com população de aproximadamente 94 mil habitantes. A localidade de Porto de Galinhas foi escolhida

a partir dos registros de criadouros de *Biomphalaria glabrata* e do elevado número de casos de esquistossomose que vem sendo notificados ao longo dos últimos 20 anos pelo Laboratório de Referência em Esquistossomose do IAM/Fiocruz.

4.4 INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO *S. mansoni* E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS

Foram utilizados camundongos heterogênicos (machos ou fêmeas), da linhagem Swiss Webster, com 7-8 semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto Aggeu Magalhães - IAM/FIOCRUZ. Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas (10 animais por gaiola), sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C), luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro) e receberam comida e água ad libitum. Os camundongos foram colocados em frascos de vidro individuais de boca larga (capacidade de 300ml), com tampas aeradas (furadas), contendo água que cubra as patas e a cauda (aproximadamente 50ml de água desclorada na base, adicionadas 120 cercárias da linhagem LE. Os animais ficaram em contato com as cercárias por 60 minutos, sob fonte de luz artificial direta, facilitando a penetração do patógeno, e temperatura de 25 °C. Foi realizada uma infecção por mês de 10 camundongos com a linhagem LE. Após sessenta dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia por meio da sobredosagem de anestésicos. Foi utilizada uma dose de 20 unidades da solução contendo 0,3 UI de Xilazina e 0,6 UI de Cetamina e posteriormente 10 unidades de Tiopental por animal. Em seguida, foi realizada perfusão com Solução Tampão Fosfato (PBS) e foi feita a coleta dos vermes adultos e fígado. Após a anestesia, foi realizada a perfusão do sistema venoso portal, através de incisão próximo aos órgãos genitais indo até a caixa torácica. Em seguida, cortou-se a veia porta e o ventrículo esquerdo foi perfundido com PBS para retirada dos vermes das veias mesentéricas.

4.5 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO I: PRODUZIR ANTÍGENOS SOLÚVEIS A PARTIR DOS VERMES ADULTOS (SWAP) DE *S. mansoni* PARA DETECTAR O ISÓTIPO IgG4 EM SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Aproximadamente 300 vermes adultos machos por lote foram acondicionados em 1mL de PBS pH 7,2 contendo 1x inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis,

EUA). Em seguida, foram submetidos à sonicação para quebra das moléculas. O homogeneizado foi clarificado por centrifugação a 40.000 x g, por 2,5 h, a 4°C seguido de recuperação do sobrenadante contendo antígenos solúveis. O teor de proteína foi determinado usando o kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA). Realizou-se também uma eletroforese em gel de poliacrilamida para comparação das porções proteicas de cercárias, ovos e vermes adultos machos e fêmeas, para análise em estudos posteriores (Resultados não mostrados).

4.6 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO II: PADRONIZAR O MÉTODO DE “ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY” (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgG4 ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

O ELISA indireto foi utilizado para detecção de anticorpos IgG4 total específico para vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni*. As placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com os antígenos na concentração de 10µg/mL diluídos em tampão Carbonato-Bicarbonato (100µL/poço) e incubando-se overnight a 4°C. No dia seguinte, realizou-se três lavagens com solução PBS-Tween 0,05% e bloqueio com a adição de 150µL de PBS-Tween-Leite 3% em cada poço e incubação por 1h à 37 °C. Em seguida, realizou-se três lavagens com PBS-Tween 0,05% e adicionou-se 100µL por poço do soro dos indivíduos, em duplicatas, diluídos nas proporções de 1:10 e incubação por 1h à 37°C. Posteriormente, nova etapa com três lavagens foi realizada e adicionou-se 100µL/poço do anti-IgG4 humano, biotilado, produzido em ratos (555882-BD Pharmingen), diluído 1:5.000 (Após testes comas diluições de 1:5000, 1:10000 e 1:50000), em PBS-Tween-Leite 1% e incubação por 1h à 37°C. Após nova etapa com três lavagens, adicionou-se 100µL/poço da solução de Streptavidin Peroxidase diluída em PBS-Tween-Leite 1% na proporção de 1:1.000 e incubação por 1h à 37°C. Após três lavagens, adicionou-se 100µL/poço da solução de revelação com OPD (Orthophenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) dissolvido em tampão tris-citrato 0,1M (pH 5,5) e H₂O₂, e incubou-se em câmara úmida escura por 20 minutos. Para leitura, utilizou-se filtro de 450nm sem solução de parada para obtenção da densidade óptica (D.O.), e, após adição da solução (50µL de H₂SO₄ a 3N), realizou-se uma segunda leitura com o filtro de 492nm. Soros de indivíduos de área não endêmica e negativos para *S. mansoni* pelo Kato-

Katz e Nested-PCR foram utilizados para cálculo do ponto de corte (*Cut-Off*), obtido por meio da média dos soros controle adicionados de duas vezes o desvio padrão.

4.7 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO III: CORRELACIONAR OS NÍVEIS DE IgG4, A CARGA PARASITÁRIA, SEXO E IDADE EM AMOSTRAS COLETADAS DE INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA

Foi realizada uma análise de correlação entre os níveis de anticorpos IgG4 e o sexo, idade e carga parasitária dos indivíduos por meio de análise univariada dos resultados positivos e negativos para IgG4 pelo Chi-quadrado. Inicialmente, foi realizada uma apresentação descritiva dos dados. Em seguida, os resultados obtidos com o ELISA foram apresentados em gráfico do tipo dot plot e descrição da média e desvio padrão ($\pm$ DP). Realizou-se o teste t não paramétrico Mann-Whitney para verificar diferenças significativas. A curva ROC foi utilizada para verificar a sensibilidade e especificidade da técnica. Os testes estatísticos foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para realização das análises e gráficos.

5 RESULTADOS

A obtenção das amostras utilizadas para realização desse estudo ocorreu a partir de um inquérito epidemiológico realizado em Porto de Galinhas, município de Ipojuca-PE. Amostras de 344 indivíduos foram utilizadas nesse projeto, contando com participantes com média de idade de 32,46 anos (1 – 84), com 48,55% de participantes de sexo masculino e 51,45% do sexo feminino. Para realização do ELISA, foram testadas algumas diluições para o IgG4, cuja diluição de 1:5.000 apresentou os melhores resultados. A leitura dos resultados das placas foi realizada em leitor de ELISA com absorbância de 450nm e 492nm, para dessa forma calcular a densidade óptica (D.O.). Os resultados apresentados na figura 8 abaixo demonstram a comparação dos níveis de IgG4 anti-SWAP entre indivíduos infectados por *S. mansoni*, detectados no método Kato-Katz, e indivíduos não infectados.

A leitura realizada com filtro de 450nm (Fig. 8A) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,5560$) entre indivíduos que eram positivos para *Schistosoma mansoni* e o grupo dos não infectados. O grupo dos infectados pelo *S. mansoni* apresentou média de D.O.: 0,172 ($DP\pm 0,173$), enquanto os não infectados exibiram média de D.O.: 0,175 ($DP\pm 0,1842$). No entanto, a leitura realizada com filtro de 492nm (Fig. 8B) demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$), em que o grupo dos infectados pelo *S. mansoni* apresentou média de D.O.: 0,676 ($DP\pm 0,731$), enquanto o grupo dos não infectados apresentaram média de 0,330 ($DP\pm 0,6519$).

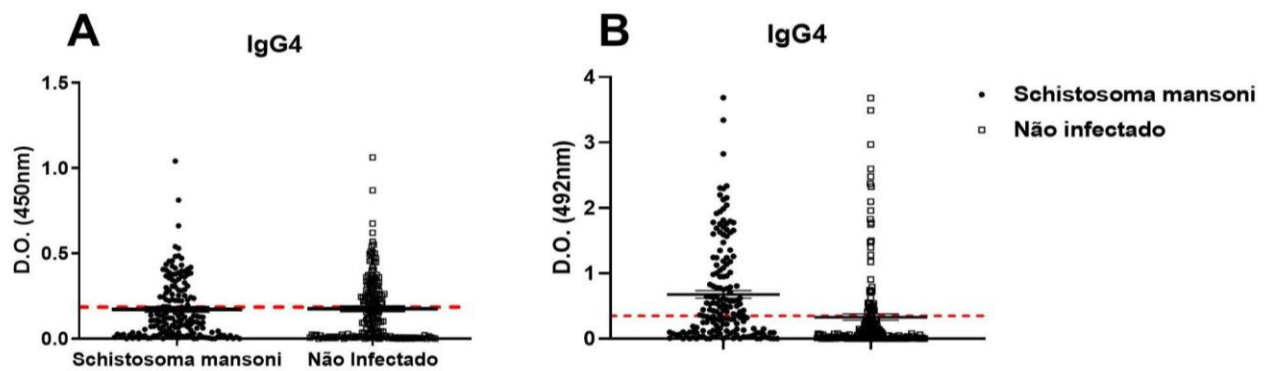


Figura 8: Comparação dos níveis de IgG4 entre indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados. Fonte: O autor

Na figura 9 está apresentada a curva ROC realizada para as duas leituras, posteriormente utilizadas para verificação da área abaixo da curva e testar a sensibilidade e especificidade. Na leitura de 450nm (Fig. 9A), a área obtida foi de 0,518, com valor de $p= 0,555$ (IC95% 0,457 - 0,579), sendo não significativa. A leitura de 492nm (Fig. 9B) demonstrou uma área com valor de 0,715, com valor de $p<0,0001$ e (IC95% 0,660 - 0,769).

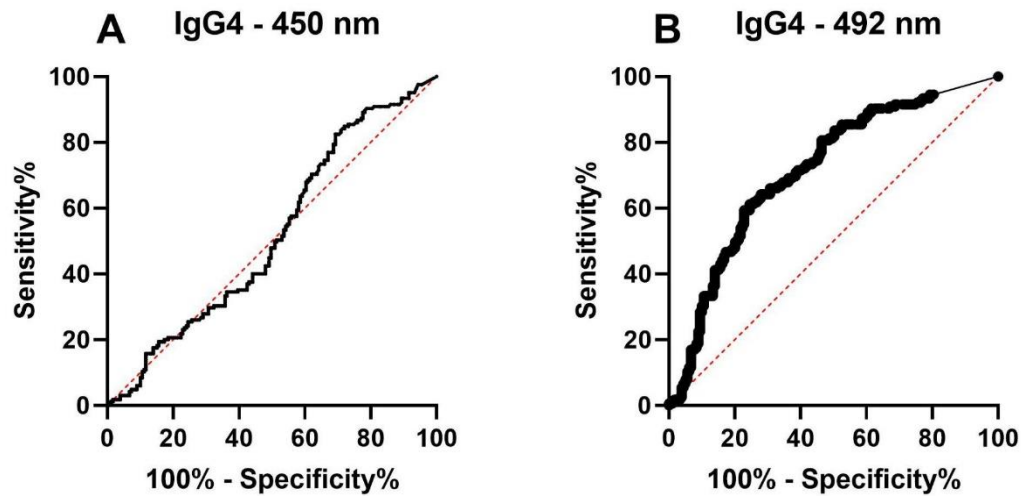


Figura 9: Comparação das Curvas ROC realizadas na leitura de 450nm e 492nm.
Fonte: O autor.

O teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher foi realizado tanto na leitura de 450nm como 492nm, para verificar a associação dos níveis de anticorpos IgG4 nos grupos de pacientes infectados pelo *S. mansoni* e o grupo não infectado e para avaliação da sensibilidade e especificidade. Além disso, também foi avaliado o Odds Ratio (OR), IC95% e o valor de p obtido nas duas leituras apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Comparação da positividade no ELISA indireto para anticorpos IgG4 nos grupos de pacientes infectados pelo *S. mansoni* detectados por meio do Kato-Katz e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450nm e 492nm.

	<i>S. mansoni</i> N (%)	Não infectado N (%)	Total N (%)	OR	IC95%	Sensibilidade	Especificidade	Valor de p*
450nm	IgG4 +	27 (15,08)	123 (35,75)	7,833	4,688 – 13,16	58,18%	84,92%	<0,0001
	IgG4 -	152 (84,92)	221 (64,25)					
	Total	179 (100)	344 (100)					
492nm	IgG4 +	37 (20,67)	132 (38,37)	5,208	3,225 – 8,270	57,58%	79,33%	<0,0001
	IgG4 -	142 (79,33)	212 (61,63)					
	Total	179 (100)	344 (100)					

* Diferença significativa quando valor de $p < 0,05$ pelo teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher. Fonte: O autor.

Para correlação dos níveis de IgG4 com sexo, idade e carga parasitária, foi realizada análises por meio do teste Chi-quadrado com teste exato de Fisher. A leitura de 492nm foi escolhida para essa análise pois apresentou melhor resultado, exibindo diferenças entre os infectados e não infectados pelo teste de Mann-Whitney. Os dados obtidos das correlações estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG4 anti-SWAP e o sexo, idade e carga parasitária de infectados e não infectados por meio de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492nm.

Variáveis socio-demografia e carga parasitária		<i>S. mansoni</i> N (%)		Total N (%)	OR IC95%	Valor de p*	Não infectado N (%)		Total N (%)	OR (IC95%)	Valor de p*
		IgG4 +	IgG4 -				IgG4 +	IgG4 -			
Sexo	Masculino	69 (72,63)	36 (51,43)	105 (63,63)			15 (40,54)	47 (33,10)	62 (34,64)		
	Feminino	26 (27,37)	34 (48,57)	60 (36,37)	2,506 (1,310 - 4,668)	0,0057	22 (59,46)	95 (66,90)	117 (65,36)	1,378 (0,6364 - 2,786)	0,4400
	Total	95 (100)	70 (100)	165 (100)			37 (100)	142 (100)	179 (100)		
	≤19 anos	20 (21,05)	24 (34,29)	44 (26,67)	-	-	12 (32,43)	46 (32,39)	58 (32,40)	-	-
Idade	20 ≤ 59 anos	65 (68,42)	41 (58,57)	106 (64,24)	0,525 ^a (0,267 - 1,078) ^a	0,102 ^a	25 (67,57)	78 (54,93)	103 (57,55)	0,813 ^a (0,366 - 1,714) ^a	0,698 ^a
	≥ 60 anos	10 (10,53)	5 (7,14)	15 (9,09)	0,792 ^b (0,286 - 2,380) ^b	0,782 ^b	0 (0)	18 (12,68)	18 (10,05)	-	-
	Total	95 (100)	70 (100)	165 (100)	-	-	37 (100)	142 (100)	179 (100)	-	-
	≤ 99 OPG	51 (53,69)	47 (67,14)	98 (59,39)	-	-	-	-	-	-	-
Carga Parasitária	100 ≥ 399 OPG	28 (29,47)	13 (18,57)	41 (24,85)	0,503 ^c (0,236 - 1,117) ^c	0,092 ^c	-	-	-	-	-
	≥ 400 OPG	16 (16,84)	10 (14,29)	26 (15,76)	1,346 ^d (0,496 - 3,517) ^d	0,605 ^d	-	-	-	-	-
	Total	95 (100)	70 (100)	165 (100)	-	-	-	-	-	-	-

* Diferença significativa quando valor de $p < 0,05$ pelo teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher.

^a comparação em relação à faixa etária menor ou igual a 19 anos. ^b comparação em relação à faixa etária de 20 a 59 anos.

^c comparação em relação à carga parasitária de ≤ 99 OPG

^d comparação em relação à carga parasitária de 100 ≥ 399 OPG

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Diante da dificuldade na diferenciação de pacientes verdadeiramente infectados com baixas cargas parasitárias, sobretudo em regiões endêmicas, é necessário a formulação de novas metodologias que auxiliem o diagnóstico correto e preciso. Dessa forma, novos métodos serviriam como complemento do método Kato-Katz, suprimindo, assim, limitações inerentes ao método. As técnicas sorológicas surgem como uma boa alternativa para isso; no entanto, devido às questões imunológicas do organismo, como a própria memória celular e humoral, esses testes, como ELISA, podem falhar devido a este fato.

Neste estudo, foi realizada a padronização de um ensaio de ELISA indireto para detecção IgG4 anti-SWAP, como uma alternativa para o diagnóstico da esquistossomose. O método obteve uma sensibilidade de 57,58% e especificidade de 79,33%. Esses valores foram obtidos na leitura de 492nm, que apresentou diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos IgG4 anti-SWAP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, detectados pelo método Kato-Katz e indivíduos não infectados. Na curva ROC realizada para leitura de 492nm, obteve-se uma área abaixo da curva com valor de 0,715 e valor de $p < 0,0001$ (IC95% 0,660 - 0,769).

A IgG constitui aproximadamente 75% do total das imunoglobulinas séricas, podendo ser subdividida em quatro subclasses, da IgG1 à IgG4. Cada uma delas possui propriedades estruturais e biológicas que as diferenciam, desde a capacidade de ativação do sistema complemento ao bloqueio de agentes endógenos e exógenos. A IgG4 é a subclasse encontrada em menor concentração no soro, podendo corresponder a cerca de 0,7 até 4,2% das IgGs em adultos clinicamente normais (SARNAGO *et al.*, 2018). Outro aspecto importante a se destacar são as variações nos valores da IgG4 de acordo com a faixa etária, se estabilizando na idade adulta com uma concentração aproximada de 0,052 - 1,250 g/L (TIAN *et al.*, 2020).

A IgG4 também pode sofrer alterações em seus níveis de acordo com a etnia e o sexo dos indivíduos. Os indivíduos asiáticos e negros possuem maiores concentrações de subclasses de IgG4 em comparação aos indivíduos brancos, enquanto os pacientes do sexo masculino têm concentrações de IgG4 mais altas do que as de pacientes do sexo feminino. Essas observações podem afetar a interpretação de resultados baseados em níveis de IgG4 tanto nas análises clínicas quanto em pesquisas (HARKNESS *et al.*, 2020).

Apesar disso, foi demonstrado que essa classe pode ser responsável por 50% da IgG total em infecções parasitárias e respostas alérgicas, o que a torna um bom alvo para diagnósticos imunológicos. Além disso, a IgG4 específica para os antígenos do verme adulto de *S. mansoni* diminui algumas semanas ou meses depois do tratamento, o que, possivelmente, a torna uma excelente candidata para diferenciar infecções ativas de tratadas anteriormente (DUVALL *et al.*, 2014). Outro aspecto relevante sobre sua utilização é que a mesma foi correlacionada com a carga parasitária de espécies de *Schistosoma* em diversos estudos, sendo a carga parasitária um dos fatores que mais interferiram na reatividade de IgG4 anti-SEA e SWAP (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; JIZ *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2001; MATOSO, 2012); no entanto, nosso trabalho não demonstrou correlação entre os níveis de IgG4 anti-SWAP e intensidade de infecção, o que pode ser atrelado a utilização de antígenos mais puros em outros trabalhos ou até mesmo metodologias mais sofisticadas da técnica de ELISA.

A relação IgE/IgG4 específicas também não foi analisada no nosso estudo; no entanto, trabalhos já demonstraram que o equilíbrio dessa relação está associado à susceptibilidade e resistência à reinfeção pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2019; CALDAS *et al.*, 2000). A elevação dos níveis de IgE específica foram associados à resistência à infecção (DUNNE *et al.*, 1992; COLLEY *et al.*, 2014; DESSEIN *et al.*, 1993); enquanto o balanço favorável ao IgG4 específico para SWAP foi associado ao aumento da taxa de reinfeção em um estudo de acompanhamento pós-tratamento de 2 anos (LI *et al.*, 2001).

ZHAO e colaboradores identificaram que a IgG4 é específica para SWAP, assim como a IgE podem ser utilizadas como bons biomarcadores para identificar a infecção por *S. japonicum*. Além disso, gerou modelos com base nos anticorpos específicos para avaliação da capacidade discriminativa da infecção em duas coortes e utilizaram a idade e sexo como covariáveis para essa formatação. Entretanto, não avaliaram a correlação dessas variáveis com níveis de anticorpos. No nosso estudo, realizamos essa avaliação e não foi encontrada diferenças significativas entre os sexos nem entre os grupos de idade avaliados como demonstrado na tabela 2.

A correlação negativa pode ter ocorrido por conta da alta miscigenação no estado de Pernambuco (MOURA, 2018), o que pode interferir na análise dos níveis de anticorpos, além disso, as condições sanitárias e o déficit no saneamento básico onde residem os participantes do estudo propiciam quadros de reinfeções (GOMES

et al., 2022; FIGUEIREDO *et al.*, 2012). Todavia, já foi demonstrado que o nível da IgG4 pode variar ao passar do tempo de infecção ao longo de anos; no entanto também não foi encontrada diferenças significativas entre os grupos de idade selecionados. Além disso, foi demonstrado que a IgG4 anti-SEA possui um melhor poder de distinguir a infecção (MATOSO, 2012); no entanto, no nosso estudo não realizamos a análise de anticorpos específicos para antígenos de ovos.

Dessa forma, muitas técnicas surgem como auxílio para o diagnóstico da esquistossomose, como PCR, LAMP, POC-CCA e o ELISA. No entanto, as técnicas moleculares, em sua maioria são bem mais caras em relação às outras técnicas, apesar de possuírem uma boa eficácia. Assim, o método do ELISA surge como uma opção de destaque para sanar esse problema. É uma técnica mais barata comparada aos métodos moleculares e que não demanda de equipamentos tão custosos em relação às técnicas moleculares para sua realização (CAI *et al.*, 2019). Além disso, é indicada para estudos populacionais e para o diagnóstico de baixa carga parasitária, tendo como vantagem, também, a diferenciação de indivíduos de fase aguda e crônica e a possibilidade de detecção de casos ectópicos da esquistossomose.

As limitações encontradas na utilização do SWAP podem ter acontecido devido ao extrato utilizado possuir diversas proteínas do verme que podem prejudicar a precisão do teste, assim como reações cruzadas com antígenos de outros parasitas, uma vez que quadros de coinfeções são comuns em áreas com problemas sanitários (FIGUEIREDO *et al.*, 2012); no entanto, não averiguamos esse tipo de relação no estudo, pois não foi analisado nenhum soro de paciente coinfectado. Esses fatos podem ter repercussão direta na sensibilidade e especificidade do teste, ainda que tenha sido utilizado apenas vermes machos para evitar reações cruzadas com proteínas dos ovos produzidos pelas fêmeas. Por fim, ressalta-se a importância da realização de pesquisas acerca de metodologias melhores para purificação de antígenos, assim como estudos longitudinais para uma melhor averiguação dos discriminantes sociais e demográficos que podem se correlacionar com níveis de anticorpos nos pacientes.

7 CONCLUSÃO

Métodos de diagnósticos mais assertivos, que possibilitem, de maneira prática, a diferenciação dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* dos não infectados, são de extrema importância para o acompanhamento mais exato da situação epidemiológica da esquistossomose, além de permitir um diagnóstico mais eficiente para o paciente, fato esse que tem contribuição direta no seu prognóstico futuro. Diante disso, evidencia-se a urgência de novos estudos que abordem o melhoramento e criação de novos testes, sobretudo porque o método de Kato-Katz, em áreas de baixa endemicidade, apresenta baixas sensibilidades, gerando resultados falso-negativos e dados subestimados acerca da parasitose que confundem muitas vezes a conduta médica para o caso em estudo. Aqui, conseguimos realizar uma técnica capaz de detectar IgG4 anti-SWAP capaz de identificar a infecção ativa.

Nesse estudo, foi observada uma diferença nos valores de densidade óptica de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados quando a leitura foi realizada com filtro de 492 nm utilizando-se o SWAP, assim, foi possível obter um teste de ELISA para o IgG4 anti-SWAP usando a diluição de 1:5.000, que apresentou sensibilidade de 57,58%% e especificidade de 79,33%. No entanto, na análise das correlações dos níveis de IgG4 com sexo, idade e carga parasitária não foi observada associação nesse estudo.

Dessa forma, ressalta-se a importância da continuidade do trabalho para preencher as lacunas identificadas, visando a padronização de um método de ELISA para detecção dos anticorpos citados, auxiliando de maneira efetiva no diagnóstico desta parasitose. Além disso, o emprego de novas metodologias de purificação de antígenos e a utilização do SEA podem se destacar como perspectivas futuras para esse estudo, para, assim, obter um teste que possa ser utilizado como confirmação nos inquéritos epidemiológicos, uma vez que pode detectar a fase da infecção com os devidos ajustes, além de auxiliar no diagnóstico preciso e precoce da esquistossomose, corroborando, assim, para um melhor prognóstico dos indivíduos infectados.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, L. S.; COSTA, D. M.; ALMEIDA, M. C. F.; SOUZA, R. P.; CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I.; OLIVEIRA, R. R. Risk factors for asthma in a helminth endemic area in bahia, Brazil. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 796820, jan. 2012.
- FIGUEIREDO, J. P.; OLIVEIRA, R. R.; CARDOSO, L. S.; BARNES, K. C.; GRANT, A. V.; CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 604–610, 2012.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose Mansoní e Geohelmintoses**. [s.l: s.n.].
- DUBEUX, L. S.; JESUS, R. P. F. S. DE; SAMICO, I.; MENDES, M. F. DE M.; WANDERLEY, F. S. O.; TOMASI, E.; NUNES, B. P.; FACCHINI, L. A. Avaliação do Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas para o controle da esquistossomose mansônica em três municípios hiperendêmicos, Pernambuco, Brasil, 2014. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, v. 28, n. 2, p. e2018085, 2019.
- OLIVEIRA, E. C. A. DE; SILVA, I. E. P. DA; FERREIRA, R. J.; BARBOSA, C. S. Incompleteness of deaths by schistosomiasis in the mortality information system in Pernambuco, 2000-2014. **Revista de Gestão e Sistemas de Saúde**, v. 8, n. 3, p. 343–353, 2019.
- WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148–54, 2007.
- DEFRANCO, A.; LOCKSLEY, R.; ROBERTSON, M. Immunity: The Immune Response to Infectious and Inflammatory Disease. **London: Oxford University Press**, 2007. v.1
- CAI, P.; WEERAKOON, K. G.; MU, Y.; OLVEDA, R. M.; ROSS, A. G.; OLVEDA, D. U.; MCMANUS, D. P. Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis japonica: Lessons learnt from a setting of low infection intensity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–17, 2019.
- BRASIL. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní - Diretrizes técnicas**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, E. J. DE; KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. DE S.; SOARES, L. C. B.; LIMA, D. M. C.; CIARAVOLHO, R. M. DE C. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoní em área de baixa endemicidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 255–261, 2003.
- MATOSO, L. F. **Estudo longitudinal dos fatores relacionados à infecção e reinfecção pelo *Schistosoma mansoni* em área endêmica, Minas Gerais**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

MCMANUS et al., 2018 - MCMANUS, D. P.; DUNNE, D. W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B. J.; ZHOU, X. N. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2018.

UTZINGER, J.; RASO, G.; BROOKER, S.; SAVIGNY, D. DE; TANNER, M.; ØRNBJERG, N.; SINGER, B. H.; N'GORAN, E. K. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: Towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1859–1874, 2009.

MARCHIORI, C. H. Primeira ocorrência de Biomphalaria straminea no Sul Goiano, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 622–623, 1999.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. 2006 - Steinmann - Schisto and water resources development - review of people at-risk. **Lancet Infect Dis**, n. 6, p. 411–425, 2006.

KLOOS, H.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA QUITES, H. F.; CAETANO SOUZA, M. C.; GAZZINELLI, A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: A review. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 194–201, 2008.

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G. N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 939–967, 2015.

GRIMES, J. E. T.; CROLL, D.; HARRISON, W. E.; UTZINGER, J.; FREEMAN, M. C.; TEMPLETON, M. R. The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

WHO - 2017 - WHO. Organização Mundial da Saúde, 2017. Cruzando o bilhão: filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo e tracoma: quimioterapia preventiva para doenças tropicais negligenciadas.

SILVA DA PAZ, W.; DUTHIE, M. S.; RIBEIRO DE JESUS, A.; MACHADO DE ARAÚJO, K. C. G.; DANTAS DOS SANTOS, A.; BEZERRA-SANTOS, M. Population-based, spatiotemporal modeling of social risk factors and mortality from schistosomiasis in Brazil between 1999 and 2018. **Acta Tropica**, v. 218, n. January, 2021.

MARTINS FERREIRA, I. D. L.; PESSOA TABOSA, T. S. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 67–74, 2007.

BRITO, M. I. B. DA S.; SILVA, M. B. A.; QUININO, L. R. DE M. Situação epidemiológica e controle da esquistossomose em Pernambuco: estudo descritivo, 2010-2016. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 29, n. 2, p. e2019252, 2020.

GOMES, E. C. DE S.; SILVA, I. E. P. DA; NASCIMENTO, W. R. C. DO; LOYO, R. M.; DOMINGUES, A. L. C.; BARBOSA, C. S. Urban schistosomiasis: An ecological study describing a new challenge to the control of this neglected tropical disease. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 8, p. 100144, 2022.

BARBOSA, C. S.; SOUZA, A. T. O. F. DE; LEAL NETO, O. B.; GOMES, E. C. DE S.; ARAUJO, K. C. G. M. DE; GUIMARÃES, R. J. DE P. S. E. Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 51–58, 2015.

CARLOS DE SOUZA, F. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. DE P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose Related papers. **Rev Bras Clin Med.**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: Clinical, diagnostic and therapeutic features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1993.

Neves, David Pereira. **Parasitologia Humana / David Pereira Neves**, 13^a ed, São Paulo, Atheneu, 2016.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 91, n. 24, p. 5–9, 2019.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. **Journal of advanced research**, v. 4, n. 5, p. 445–52, set. 2013.

VIDAL, C. H. F.; GURGEL, F. V.; FERREIRA, M. L. B.; AZEVEDO-FILHO, H. R. C. DE. Epidemiological aspects in neuroschistosomiasis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 68, n. 1, p. 72–75, 2010.

BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. R. Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1187–1193, 1999.

LICHTENBERGOVÁ, L.; KOLBEKOVÁ, P.; KOUŘILOVÁ, P.; KAŠNÝ, M.; MIKEŠ, L.; HAAS, H.; SCHRAMM, G.; HORÁK, P.; KOLÁŘOVÁ, L.; MOUNTFORD, A. P. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 11–12, p. 585–595, 2008.

STADECKER, M. J. The regulatory role of the antigen-presenting cell in the development of hepatic immunopathology during infection with *Schistosoma mansoni*. **Pathobiology**, v. 67, n. 5–6, p. 269–272, 1999.

HOGG, K. G.; KUMKATE, S.; ANDERSON, S.; MOUNTFORD, A. P. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3563–3571, 2003.

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

PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p. 159–166, 1991.

RUMBLEY, C. A.; SUGAYA, H.; ZEKAVAT, S. A.; REFAEI, M. EL; PERRIN, P. J.; PHILLIPS, S. M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 2, p. 1003–9, 1999.

JASSIM, A.; HASSAN, K.; CATTY, D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol**, v. 9, n. 6, p. 627-50, nov. 1987.

KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; OUMA, J. H.; KEMIJUMBI, J.; BUTTERWORTH, A. E.; DUNNE, D. W.; FULFORD, A. J. C. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: Age dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 101–105, 1999.

FITZSIMMONS, C. M.; JONES, F. M.; MOIRA, A. P. DE; PROTASIO, A. V.; KHALIFE, J.; DICKINSON, H. A.; TUKAHEBWA, E. M.; DUNNE, D. W. Progressive cross-reactivity in IgE responses: An explanation for the slow development of human immunity to Schistosomiasis? **Infection and Immunity**, v. 80, n. 12, p. 4264–4270, 2012.

SILVA-MORAES, V.; SHOLLENBERGER, L. M.; SIQUEIRA, L. M. V.; CASTRO-BORGES, W.; HARN, D. A.; QUEIROZ E GRENFELL, R. F.; RABELLO, A. L. T.; COELHO, P. M. Z. Diagnosis of schistosoma mansoni infections: What are the choices in brazilian low-endemic areas? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 2, 2019.

SIQUEIRA, L. M. V.; GOMES, L. I.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, E. R. DE; OLIVEIRA, Â. A. DE; ENK, M. J.; CARNEIRO, N. F.; RABELLO, A.; COELHO, P. M. Z. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 209–214, 2015.

ENK, M. J.; LIMA, A. C. L.; DRUMMOND, S. C.; SCHALL, V. T.; COELHO, P. M. Z. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 222–228, 2008.

KITTUR, N.; CASTLEMAN, J. D.; CAMPBELL, C. H.; KING, C. H.; COLLEY, D. G. Comparison of schistosoma mansoni prevalence and intensity of infection, as determined by the circulating cathodic antigen urine assay or by the kato-katz fecal assay: A systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 605–610, 2016.

CNOPS, L.; TANNICH, E.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; ESBROECK, M. VAN. *Schistosoma* real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 10, p. 1208–1216, 2012.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, 2015.

DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: Can it be done with antibodies? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 35–39, 2004.

O'KENNEDY, R.; BYRNE, M.; O'FAGAIN, C.; BERNIS, G. Experimental section. A Review of Enzyme-Immunoassay and a Description of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Immunoglobulin Concentrations. **Biochemical Education**, v. 18, n. 3, p. 136–140, 1990.

SARNAGO, A.; PASCUAL, R. M.; MORENO, M. J.; LAÍZ, B.; FUSTER, O. IgG subclasses quantitation: Analytical performance of The Binding Site SPAPLUS® human assay and comparison with Siemens BNII® assay. **Clinical Biochemistry**, v. 51, n. May, p. 85–89, 2018.

TIAN, X.; DENG, Z.; WANG, S.; WANG, Y. Basic Research and Clinical Reports Associated with Low Serum IgG4 Concentrations. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 181, n. 2, p. 149–158, 2020.

HARKNESS, T.; FU, X.; ZHANG, Y.; CHOI, H. K.; STONE, J. H.; BLUMENTHAL, K. G.; WALLACE, Z. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin G subclass concentrations differ according to sex and race. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 125, n. 2, p. 190- 195.e2, 2020.

DUVALL, A. S.; FAIRLEY, J. K.; SUTHERLAND, L.; BUSTINDUY, A. L.; MUNGAI, P. L.; MUCHIRI, E. M.; MALHOTRA, I.; KITRON, U.; KING, C. H. Development of a specimen-sparing multichannel bead assay to detect antiparasite IgG4 for the diagnosis of *Schistosoma* and *Wuchereria* infections on the coast of Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 638–645, 2014.

JIZ, M. et al. Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG4. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2051–2058, 2009.

LI, YUESHENG; SLEIGH, A. C.; ROSS, A. G. P.; LI, YI; ZHANG, X.; WILLIAMS, G. M.; YU, X.; TANNER, M.; MCMANUS, D. P. Human susceptibility to *Schistosoma japonicum* in China correlates with antibody isotypes to native antigens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 441–448, 2001.

ZHAO, J.; CHEN, X.; LONG, X.; RAFAELS, N.; CAMPBELL, M.; LIANG, H.; ZHANG, B.; BARNES, K. C.; HAMILTON, R. G.; CHEN, Q. The soluble worm antigens-specific antibodies used as biomarkers of *Schistosoma japonicum* in a low prevalence and intensity endemic area of Hubei, China. **Acta Tropica**, v. 195, n. March, p. 28–34, 2019.

CALDAS, I. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLOSIMO, E.; CARVALHO, O. S.; MASSARA, C. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: Parallel cellular and isotypic immunologic

assessment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 57–64, 2000.

DUNNE, D. W.; BUTTERWORTH, A. E.; FULFORD, A. J. C.; CURTIS KARIUKI, H.; LANGLEY, J. G.; OUMA, J. H.; CAPRON, A.; PIERCE, R. J.; STURROCK, R. F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 6, p. 1483–1494, 1992.

DESSEIN, A. J.; DEMEURE, C. E.; RIHET, P.; ABEL, L.; OUATTARA, M.; BOURGOIS, A. Resistance to *Schistosoma mansoni* in Humans: Influence of the IgE/IgG4 Balance and IgG2 in Immunity to Reinfection after Chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 4, p. 1000–1008, 1993.

MOURA, R. R. **Inferência da miscigenação genética na população pernambucana e sua aplicação em estudos de associação**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE

Portal do Governo Brasileiro

 Plataforma Brasil

 [wheverton.nascimento@ufpe.br](#) 

[Esqueceu a senha?](#) [Cadastre-se](#) v3.2

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

☐
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: IMUNODIAGNÓSTICO PARA ESQUISTOSSOMOSE: SELEÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS E DESENVOLVIMENTO DE KIT PARA APLICAÇÃO EM ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE
Pesquisador Responsável: Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Contato Público: Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Condições de saúde ou problemas estudados:
Descritores CID - Gerais:
Descritores CID - Específicos:
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 13/11/2019



☐
DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Cidade: RECIFE

☐
DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5190 - Instituto Aggeu Magalhães (IAM)
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Telefone: (81)2101-2639
E-mail: cep.iam@fiocruz.br

☐
CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

☐
CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

ANEXO B

Cópia do parecer do Comitê de Ética no uso de animais do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE (CEUA/IAM)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado **"Manutenção de cepas de Schistosoma mansoni para pesquisas científicas"** protocolado sob nº **123/2017** pelo (a) pesquisador (a) **Constança Simões Barbosa** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 22 de março de 2022 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogêneo (Swiss Webster)	2.880 (30-40gr/ 7-8 semanas/ machos e fêmeas)
Total	2880

Recife (PE, Brasil), 22 de março de 2018

Dra Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora CEUA/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora de Comissão de Ética no
 Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE
 Mat. Supl. 0464761
 E-mail: britomel@cpqam.fiocruz.br