



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FÁBIO JORGE RAMALHO DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DOS FATORES SÓCIOECONÔMICOS,
AMBIENTAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
PATOGENESE DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
NA ÁREA ENDÊMICA DE ILHA DAS FLORES, SERGIPE**

ARACAJU

2011

FÁBIO JORGE RAMALHO DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DOS FATORES SÓCIOECONÔMICOS,
AMBIENTAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
PATOGENESE DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
NA ÁREA ENDÊMICA DE ILHA DAS FLORES, SERGIPE**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: _____

Prof^a. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

ARACAJU

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Amorim, Fábio Jorge Ramalho de

A524a Avaliação dos fatores socioeconômicos, ambientais e imunológicos associados à patogênese da esquistossomose mansônica na área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe / Fábio Jorge Ramalho de Amorim. – Aracaju, 2011.

000 f. : il.

Orientador (a): Profa. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. Esquistossomose 2. Schistosoma mansoni 3. Imunologia 4. Infectologia I. Título

CDU 616.993.122(813.7)Ilha das Flores)

FÁBIO JORGE RAMALHO DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DOS FATORES SÓCIOECONÔMICOS,
AMBIENTAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
PATOGENESE DA ESQUISSOMOSE
MANSÔNICA NA ÁREA ENDÊMICA DE ILHA DAS
FLORES, SERGIPE**

Dissertação apresentada como exigência para
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
ao Núcleo de Pós- graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe.

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora da Dissertação:

Prof^a. Dr^a. Amélia Maria Ribeiro de Jesus (Orientadora)

Prof^a Dr^a Ângela Maria da Silva

Prof^a Dr^a Tatiana Rodrigues de Moura

PARECER

ARACAJU

2011

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

*Dedico este trabalho aos meus pais
Jorge Alberto e Fátima Ramalho,
aos meus irmãos
Felipe Ramalho e Jorge Júnior,
e ao meu avô João Ramalho (in memoriam).*

“Tudo o que um sonho precisa para
ser realizado é alguém que acredite
que ele possa ser realizado”

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter me dado uma família especial e ter proporcionado conhecer pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram superadas e que me deram força para viver e buscar a cada dia a felicidade.

Aos pacientes que participaram deste estudo e à toda a população de Ilha das Flores, pelo acolhimento às nossas visitas à área endêmica, pela paciência e colaboração na realização do inquérito clínico e dos exames e por acreditarem no nosso trabalho.

Aos funcionários do posto de saúde de Ilha das Flores Jorge Feitosa, Mário César Silva, Edmilson Nicolau dos Santos pela colaboração na pesquisa e pela realização dos exames parasitológicos de fezes e ao motorista Silvino José Dos Santos Neto, parceiro de todas as viagens.

A todos os meus familiares, avós, tios, tias, primos, em especial a minha avó Josefa Tavares e minha tia Francinella Ramalho por serem segunda e terceira mãe, não necessariamente nesta ordem. E a Ana Carolina Guimarães. A todos, muito obrigado pelo incentivo, orações e paciência.

Agradecimento especial à Prof^a Amélia Maria Ribeiro de Jesus, minha orientadora, pela paciência e dedicação ao trabalho e ao orientando. Pelo amor e dedicação que foram dados no tratamento com os pacientes e a todos de Ilha das Flores. Com certeza foi um presente de Deus.

Aos professores, membros e colaboradores do grupo de pesquisa: Roque Pacheco, Ângela Maria da Silva, Mário Adriano dos Santos, Enaldo Vieira de Melo, Paulo Leopoldo, Tatiana Moura, Alex Vianey, Frederico Santana de Lima, Cândida Vasconcelos, Cárcia Passos, Priscila Lima, Marise Simon, Ricardo de Melo, Karla C. V. Rollemberg, Cybele Bonfim, Cinthia Andrade, Nayanna Lessa, Marcos Seabra, Anny Porto Chagas e Dra. Karine Schuster Franco por todo o apoio e contribuição direta com o trabalho.

À Carla V. V. Rollemberg, parceira de mestrado, amiga pessoal e uma das principais colaboradoras deste trabalho. Creio que seria muito mais difícil a conclusão deste trabalho sem ela como componente da equipe.

Ao prof. José Antônio Pacheco de Almeida e à equipe de pesquisadores da Geografia, Marília Silva, Acácia Souza e Alexandra Lima, parceiros de todas as viagens à área endêmica e que muito colaboraram com o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Evan Secor do Center for Disease Control (CDC), USA, pelo fornecimento dos antígenos de *Schistosoma mansoni*, vitais para a realização dos experimentos imunológicos.

Aos farmacêuticos e amigos que muito colaboraram comigo nesta caminhada, Adalberto Dantas, Rodrigo Vasconcelos, José Guilherme, Carlos Eduardo, Simone Fontes, Antônio Franklin, Antônio Vital, Álvaro Victor e José Barreto.

A todos os colegas na Unidade de Saúde da Família Francisco Fonseca pelo apoio, em especial à Jennifer Gomes, Manoel Vagner Farias, Luzinete dos Santos e Rosemary dos Santos, ainda à Prof^a. Maria José de Freitas (CEPS).

A minha coordenadora Dra. Flávia Oliveira da Costa e a todos os colegas do laboratório do Hospital Universitário, Ívina Elaine, Ivone Camargo, Djane Oliveira, Dagmar Gonçalves, Lúcia Maria Bessa, Suely Barreto, Adilson Ramos, Alessandra de Deus, Ana Paula Menezes, Anacleto Neto, Dayse Rocha, Danielle Araújo, Eliana Almeida, Fábria Oliveira, Fernanda Silva, Ismael Correia, Jane Guimarães, José Severino, Luiz Armando, Manoel Messias, Maria Aparecida, Marlene Azevedo, Meire Teles, Pâmela Tamiris, Paulo Herlan, Reginaldo Bazan, Rivânia Paixão, Robson Santos, Sandro Barbosa, Viviane Almeida e a todos os demais colegas que eu possa ter esquecido, por todo o apoio dado para a conclusão deste curso.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma importante endemia mundial, que acomete mais de 200 milhões de pessoas, causada pelo *Schistosoma mansoni*. A cidade sergipana de Ilha das Flores está a 135 quilômetros da capital, ao norte do estado e possui uma população de 8.598 habitantes. Possui uma extensa área de irrigação, onde se encontram muitos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea*. Os objetivos do trabalho foram avaliar a morbidade da esquistossomose em uma área de alta prevalência da doença, através de exames parasitológico, clínico e ultrassonográfico e verificar a relação entre a infecção e a gravidade da doença com os aspectos socioeconômicos, educacionais, exposição às fontes hídricas superficiais da região e com a resposta imune aos antígenos do *S. mansoni*. Foi realizado um inquérito clínico-epidemiológico e coproparasitológico em 500 indivíduos selecionados aleatoriamente. A prevalência da esquistossomose foi de 24%, destes 65% eram do gênero masculino, tendo este uma forte associação com a infecção por *S. mansoni*. Trinta e três por cento (33,3%) apresentaram formas clínicas hepatointestinal ou hepatoesplênica. Os pacientes com maior grau de contato com a água, como os pacientes com a forma hepatoesplênica, apresentaram uma maior intensidade de infecção (ovos/g de fezes). Devido ao pequeno número de pacientes com a forma hepatoesplênica, para o estudo imunológico foram incluídos mais 20 pacientes recrutados por busca ativa no ambulatório de Gastrohepatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. O exame de ultrassonografia abdominal foi realizado numa amostra de 78 indivíduos de Ilha das Flores com parasitológico positivo para *S. mansoni* e nos 20 hepatoesplênicos do HU pelo método de Niamey. A avaliação da resposta imune mostrou uma correlação direta entre as concentrações de IL-5 em resposta ao antígeno de verme adulto e a intensidade da infecção, bem como uma tendência das concentrações do IFN- γ em diminuir com o aumento das cargas parasitárias. Os dados imunológicos mostraram também de forma pioneira a presença de concentrações elevadas de IL-17 nas culturas de células de pacientes com a forma mais grave da doença. Estes dados revelam a influência de fatores socioeconômicos, culturais e imunológicos na gravidade da infecção por *S. mansoni*.

Palavras-Chave: esquistossomose; forma hepatoesplênica; resposta imune.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an important endemic disease worldwide, affecting over 200 million people. The city of Flores Island, Sergipe, is situated 135 km from the capital, North of the State and has 8,598 inhabitants. Has an extensive irrigation area, where there are many species of snails *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. The objectives were to evaluate the morbidity of schistosomiasis in an area of high prevalence of disease by parasitologic, clinical and ultrasound examinations and the relation between infection and disease severity with socioeconomic, educational, exposure to surface water sources in the region and the immune response. A survey was conducted clinical, epidemiological and parasitologic in 500 randomly selected individuals. The prevalence of schistosomiasis was 24%, and 65% of these were male. There is an association between male with *S. mansoni* infection. Thirty tree percent (33.3%) had clinical forms hepatointestinal or hepatosplenic. Patients with a greater degree of contact with water had higher worm burdens, just as patients with hepatosplenic disease had the higher infection intensity (eggs / g stool). Due to the lower number of hepatosplenic patients, for the immunological studies we have selected 20 patients with confirmed hepatosplenic schistosomiasis actively recruited from the Gastro-hepathology ambulatory of the Hospital Universitário of the Universidade Federal de Sergipe. The abdominal ultrasound examination was performed on a sample of 78 subjects from Ilha das Flores with positive parasitological for *S. mansoni* and in the 20 hepatosplenic patients from the hospital by the method of Niamey. The evaluation of immune response reveled a direct correlation between the concentrations of IL-5 in response to adult worm antigen and the intensity of infection, as well as a tendency for concentrations of IFN- γ to decrease with the increase the intensity of infection. The immunological data also showed, for the first time, the presence of high concentrations of IL-17 in cultured cells of patients with more severe disease. These data reveal the influence of socioeconomic, cultural and immunological factors on severity of infection by *S. mansoni*.

Keywords: Schistosomiasis; form hepatoesplenic; immune response.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IL- Interleucina

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PCE - Programa de Controle da Esquistossomose

PECE – Programa Especial de Controle da Esquistossomose

SEA - Antígeno solúvel do ovo

SWAP - Antígenos solúvel de verme adulto

SIG - Sistema de Informação Geográfica

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 Introdução e Justificativa	13
2 Revisão da Literatura	15
2.1 O <i>Schistosoma mansoni</i> :	15
2.2 A História da doença no Brasil:	17
2.3 Aspectos Clínicos.....	18
2.4 Exame clínico na avaliação da esquistossomose	21
2.5 O uso da ultrassonografia na esquistossomose	22
2.6 Resposta imune na esquistossomose.....	25
2.6.1 Mecanismos imunológicos associados à resistência à infecção.....	25
2.6.2 Imunopatogênese da esquistossomose aguda.....	26
2.6.3 Imunopatogênese da fase crônica da esquistossomose	27
3. Objetivos	38
4. Metodologia	39
4.1 Área de estudo	39
4.2 Desenho do estudo, seleção e tamanho da amostra a ser estudada:	40
4.3 Inquérito clínico epidemiológico e coparassitológico.....	40
4.3.1 Exame Clínico.....	41
4.3.2 Exame coparassitológico.	41
4.3.3 Definição do grau de contato com águas naturais.....	42
4.4 Georreferenciamento das casas participantes do estudo utilizando Sistema de informação geográfica (SIG)	43

4.5 Ultrassonografia	43
4.6 Metodologia do objetivo 01	44
4.6.1 Análises dos dados	44
4.7 Metodologia do objetivo 2	45
4.7.1 Seleção de pacientes e critérios de inclusão e exclusão	46
4.7.2 Coleta de sangue	46
4.7.3 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	46
4.7.4 Avaliação imunológica	47
4.7.5 Análises estatísticas.....	48
4.8 Metodologia do objetivo 3	48
4.8.1 Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão.	48
4.8.2 Avaliação imunológica	49
4.8.3 Análises estatísticas	50
5 Resultados	51
5.1 Descrição dos aspectos demográficos e epidemiológicos da população estudada ...	51
5.2 Descrição dos aspectos demográficos e epidemiológicos dos indivíduos com diferentes forma clínicas	54
5.3 Avaliação da resposta imune celular em indivíduos classificados de acordo com a intensidade da infecção	59
5.4 Avaliação da resposta imune celular em indivíduos classificados de acordo as formas clínicas da doença determinadas por exame físico e ultrassonográfico.....	61
6 Discussão	65
7 Conclusão.....	74
8 Considerações éticas	75
9 Referências.....	76
10 Apêndice I.....	84

Apêndice II.....	88
------------------	----

AVALIAÇÃO DOS FATORES SÓCIOECONÔMICOS, AMBIENTAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À PATOGÊNESE DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NA ÁREA ENDÊMICA DE ILHA DAS FLORES, SERGIPE

1. Introdução e Justificativa

A esquistossomose é uma endemia mundial acometendo mais de 200 milhões de pessoas, ocorrendo em 76 países, principalmente naqueles subdesenvolvidos e em desenvolvimento na América do Sul e Central, Ásia e África (WHO, 2011). Cerca de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. São descritos 7,1 milhões de indivíduos infectados no Brasil. A maior parte dos casos concentra-se na região Nordeste. A prevalência e a incidência da doença sofreram um forte impacto no Brasil após a implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), em 1975, com a instituição de tratamento em massa da população e uso de moluscicidas. Em algumas áreas a melhoria geral das condições ambientais da população levou a um controle mais eficiente da transmissão (Coura-Filho, 1997). O tratamento em massa dos infectados instituído pelo PECE, levou a 43% de redução nas hospitalizações e 56% da mortalidade devido à esquistossomose de 1979 a 1997 (Katz, Peixoto, 2000; Amaral *et al*, 2006).

Em Sergipe, o PECE foi iniciado em 1976. Atualmente, são em média 13.274 pessoas infectadas no Estado. Estudo recente, analisando dados do programa de controle da esquistossomose (PCE), mostrou que a prevalência permaneceu estável de 2005 a 2008, com uma média de 11,8%. Houve positividade parasitológica em todos os municípios do estado que mandaram dados para o PCE, e em uma média de 40% dos municípios foi detectada uma prevalência igual ou maior que 20%. Ilha das Flores,

município escolhido para o estudo e cuja população é de 8.874 habitantes, possui uma prevalência de 46,45% (PCE, 2008; Rollemberg, 2011).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na fibrose hepática ainda requerem estudos mais aprofundados. Estudos tanto em modelos experimentais como na espécie humana mostram que, enquanto os eventos iniciais da formação do granuloma estão associados a uma resposta Th2, não há uma clara compreensão do que ocorre nos estágios posteriores da fibrose. Principalmente nas fases mais graves da forma hepatoesplênica, há uma dificuldade de avaliar a resposta imune, geralmente por uma supressão da resposta *in vitro* a antígenos que ocorre nestes pacientes. Estudos realizados na África mostraram uma produção elevada de TNF- α , receptor solúvel do TNF, ICAM-1 solúvel e IFN- γ , e níveis baixos de IL-5 estão associados com hepatoesplenomegalia em humanos com esquistossomose mansônica (Mwatha, 1998). A concomitância de Malária na região estudada tornou o estudo de difícil interpretação, principalmente pela sabida produção elevada de TNF- α na malária. Recente estudo em modelo experimental de fibrose grave sugere a participação de IL-17 na patogênese das lesões, aspecto ainda não investigado na espécie humana (Stadecker, 2009).

O presente estudo pretende contribuir para o entendimento dos principais fatores associados à morbidade da esquistossomose, investigando fatores socioeconômicos, ambientais e culturais que influenciam na carga parasitária, assim como avaliar mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da esquistossomose, através da realização de inquérito epidemiológico, coproparasitológico e clínico na área endêmica de Ilha das Flores e através de avaliação da resposta imune celular de pacientes com diferentes graus de fibrose hepática de Ilha das Flores e em portadores da forma hepatoesplênica atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS) provenientes de outros municípios.

2. Revisão da Literatura

2.1 *O Schistosoma mansoni*

No Brasil, devido às condições ambientais, o *Schistosoma mansoni* é o único agente etiológico da Esquistossomose. É um parasito multicelular digenético, da classe trematoda, da família *Schistosomatidae*, do gênero *Schistosoma*, que necessita como hospedeiros intermediários de caramujos do gênero *Biomphalaria* para completar o seu ciclo de desenvolvimento, sendo o homem seu principal reservatório e hospedeiro definitivo (Neves, 1998). No Brasil, as três espécies de caramujos envolvidas na transmissão da doença por ordem de importância são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* que vivem em água doce, parada ou com pouca correnteza.

Roedores selvagens, como camundongos e hamsters são experimentalmente infectados e excelentes hospedeiros. No Brasil foram encontrados naturalmente infectados alguns roedores, marsupiais, carnívoros silvestres e ruminantes, mas a participação desses animais na transmissão da doença ainda não está bem definida (MS, 2005).

O ciclo biológico do parasito tem início quando os ovos do *S. mansoni* são liberados em água doce e não tratada pelas fezes do hospedeiro infectado, eclodem liberando larvas ciliadas denominadas miracídeos, formas infectantes para o hospedeiro intermediário. O parasito multiplica-se no caramujo, passando para as fases de esporocisto primário e secundário, e em quatro a sete semanas dá origem a milhares de cercárias, que são liberadas na água. As cercárias, formas infectantes para o homem, penetram ativamente pela pele íntegra e transformam-se em esquistossômulos. Estes ao chegarem num vaso, são levados passivamente até os pulmões, coração e todo o

organismo, chegando finalmente ao sistema porta intra-hepático. Nesses vasos, os esquistossômulos se alimentam e se transformam em vermes adultos machos e fêmeas, que migram acasalados para a veia mesentérica inferior (Neves, 1998), onde residem. Os vermes têm reprodução sexuada e acasalam no plexo mesentérico, liberando ovos que são excretados através dos vasos e paredes do intestino. Alguns deles são carregados pela circulação sanguínea para o sistema porta do fígado (Sleigh *et al.*, 1985).

O *Schistosoma* possui diversos mecanismos evasivos para se estabelecer no hospedeiro humano, a exemplo de enzimas proteolíticas, as quais participam desde a penetração das cercarias na pele (McKerrow *et al.*, 1983), mecanismos de evasão da resposta imune humoral por liberação de proteases capazes de clivar IgG ligadas a receptores da porção Fc, protegendo as larvas e o verme adulto do parasito da ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) (Auriault *et al.*, 1981), regulação da síntese de IgE (Verwaerde *et al.*, 1988) e inibição da ativação do complemento (Deng *et al.*, 2003, Marikovsky *et al.*, 1988). Outra maneira pela qual o *S. mansoni* pode evitar a ativação do complemento é a remoção da cobertura de glicocálix, a qual contém ativadores de complemento, por liberação do seu tegumento (Samuelson & Caulfield, 1986). Numa fase posterior, esquistossômulo e o verme adulto expressam proteínas inibidoras capazes de se ligar a proteínas do complemento em diversos estágios, a exemplo da paramiosina a qual se liga ao C1 (Deng *et al.*, 2003), a Sh-TOR que se liga ao C2 (Inal & Sim, 2000), a SCIP-1 que se liga ao C8 e C9 (Parizade *et al.*, 1994). O mimetismo molecular é um outro artifício utilizado pelo *S. mansoni* para modular a resposta imune humoral e inflamatória do hospedeiro. O mimetismo molecular consiste na expressão de moléculas homólogas do hospedeiro ou adsorção de moléculas do hospedeiro, como de MHC solúvel e DAF a fim de evitar a indução de anticorpos e células específicas. A SmSP1 é uma serina proteinase presente em diferentes estágios

do ciclo de vida do *S. mansoni* e apresenta 32% de homologia com o fator humano I e 34,5% com a proteína plasmática Kallikrein de camundongos. Apesar dessa proteína ser expressa na cutícula de machos adultos, anticorpos específicos para a SmSP1 não são detectados em ratos ou camundongos infectados por *S. mansoni* possivelmente pela sua homologia com essas proteínas do hospedeiro (Cocude *et al.*, 1999).

O período de incubação da doença é de aproximadamente duas a seis semanas. Já o período de transmissibilidade se dá a partir de cinco semanas após a infecção, quando o homem pode excretar ovos viáveis nas fezes. Com relação aos caramujos infectados, estes liberam cercarias durante toda a vida, que varia de semanas até três meses.

2.2 A História da doença no Brasil

A doença teve sua provável origem nas bacias de dois grandes rios, o Nilo na África e no Yangtze na Ásia. Existem relatos de ovos de *Schistosoma* em vísceras de múmias egípcias de idade aproximada a 1.250 a.C. (FUNASA, 1999).

No Brasil, a doença parece ter sido introduzida no período colonial, com a vinda dos escravos africanos. A prova disto é que a cidade de União dos Palmares, que foi construída sobre a Serra da Barriga, Alagoas, último reduto dos negros fugitivos que se agrupavam no histórico “Quilombo dos Palmares” constitui-se hoje, em um dos focos graves da doença (FUNASA, 1999). Inicialmente, foi detectada na Bahia em 1907, conforme estudos desenvolvidos por Manoel Augusto Pirajá da Silva (Silva, 1947).

Devido ao movimento migratório, que ocorreu a partir da década de 30, pelo fluxo de mão de obra de regiões endêmicas para outras localidades, a doença ganhou espaço, e conseqüentemente, aumentou a área endêmica, atingindo hoje quase todos os

estados brasileiros (Ariadna, 2001). As áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federativas e compreendem os estados de Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (MS, 1998).

2.3 Aspectos Clínicos

A esquistossomose é uma doença de evolução crônica, de gravidade variável, na qual a maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção.

A infecção produz as seguintes formas clínicas: a forma aguda e a forma crônica, sendo que esta se subdivide em intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Bina, 1981; Pearson, 1977).

Embora as formas crônicas sejam as mais prevalentes e mais associadas à morbidade em áreas endêmicas, a forma aguda é potencialmente mais grave, sendo relatadas altas taxas de mortalidade na China em pacientes infectados por *S. japonicum* (Rabello, 1995; WHO, 1995). A fase aguda da esquistossomose ou febre de Katayama é encontrada em indivíduos de áreas não endêmicas. Na fase de penetração das cercarias, o paciente infectado pode apresentar desde quadros assintomáticos até uma erupção papular, eritema, edema e prurido, configurando o quadro de dermatite cercariana. Após esta fase inicial, a doença pode evoluir para o quadro de esquistossomose aguda propriamente dita e apresentar sinais e sintomas gerais e inespecíficos. Em estudo realizado com indivíduos infectados em área turística de Sergipe, Lagoa do Abaís, município de Estância, observou-se que a fase aguda caracterizava-se por uma síndrome toxêmica, que ocorria em cerca de 21 dias após o contato com águas contaminadas,

podendo as manifestações clínicas persistirem até 120 dias após a infecção, coincidindo com a fase de positivação do exame parasitológico de fezes. Os sintomas característicos dessa fase foram inespecíficos como astenia (100%), eosinofilia acentuada (100%), dor abdominal difusa (93,5%), febre (90%), calafrios (80,6%), diarreia (80,6%), mialgia (74,2%), sintomas respiratórios como tosse (80,6%), dispnéia (51,6%), edema (48,4%), elevação de enzimas hepáticas (38%), insuficiência ventilatória restritiva (29%) e pericardite (19%) (Jesus, 2004). Na grande maioria dos casos os sintomas da forma aguda evoluem para a cura, com ou sem tratamento. Mas raros casos evoluem para as formas hepatoesplênica ou cardiopulmonar. As complicações e conseqüências mais comuns são o abdome agudo, enterorragia, choque, polirradiculite e síndrome semelhante à de Guillain-Barré e insuficiência respiratória aguda (Davis, 1997; Junker *et al.*, 2001)

A forma aguda tem sido vista mais comumente em indivíduos que visitam as áreas endêmicas do que em moradores destas áreas, o que sugere que os moradores podem ter sido expostos muito cedo aos antígenos do parasito, e desta forma possam estar desenvolvendo certa proteção face aos antígenos parasitários, ou pode passar despercebida, pela pobreza de sintomas e pela inespecificidade do quadro clínico, o qual é similar aos de outras doenças infecciosas agudas (Prata, 1997; Barbosa *et al.*, 2001).

Quando o paciente evolui para a forma crônica, o que pode durar vários anos, ocorrem sinais de progressão para diversos órgãos. A patogênese da forma crônica da doença resulta da resposta imune do hospedeiro aos ovos depositados pelo *Schistosoma mansoni*, principalmente no sistema venoso portal. A fibrose periportal resultante dessa resposta imune leva ao surgimento de hipertensão portal, responsável pela morbimortalidade da doença (Jesus *et al.*, 2000).

São vários os fatores que estão envolvidos na patogênese das formas graves da Esquistossomose, a exemplo da carga parasitária (Sleigh, 1985, Andrade 1978), resposta imune aos antígenos do parasito (Warren, 1975, Jesus, 2004, Magalhaes 2004, Mwatha, 1998,) e características genéticas do hospedeiro (Bina; Prata, 1978). A carga parasitária, por sua vez, é influenciada pelo grau de contato com a água (Sleigh, 1985; Rihet, 1988).

As manifestações clínicas da fase crônica da doença são (Lambertucci *et al.*, 2005):

Forma intestinal: o indivíduo apresenta apenas exame parasitológico de fezes positivo e é, na maioria das vezes, assintomático, ou apresenta sintomas inespecíficos como diarreia e dor abdominal;

Forma hepatointestinal: o indivíduo apresenta hepatomegalia, com fígado de consistência aumentada, baço impalpável e ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes;

Embora as formas intestinal e hepatointestinal não sejam responsáveis pela mortalidade da doença, essas formas clínicas são envolvidas na morbidade, pois em crianças, diarreia pode levar a desnutrição, distúrbios do crescimento e do aprendizado.

Forma hepatoesplênica: o indivíduo apresenta baço palpável ao exame físico e ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes, associada na maioria das vezes à hipertensão portal, a qual tem como complicação principal a formação de circulações colaterais e nível de esôfago e fundo gástrico.

A forma hepatoesplênica é responsável pela alta morbidade e mortalidade produzida pela doença, habitualmente devido a sangramento digestivo por ruptura das varizes esofágicas e estomacais (Bina e Prata, 2003). Esta complicação também eleva os

custos com assistência médica (Iarotski, 1981). Esta última forma clínica da esquistossomose é subdividida em compensada e descompensada. Na forma compensada há sinais de hipertensão portal, mas com a função hepática normal. A forma descompensada é mais rara atualmente e há alteração da função hepática, com aparecimento de icterícia e ascite. Outras complicações menos comuns, descritas na forma hepatoesplênica da esquistossomose incluem hipertensão pulmonar, lesão renal, infantilismo e hiperesplenismo. Na forma pulmonar e cárdio-pulmonar, predomina uma arteriolite obstrutiva, insuficiência cardíaca direita e perturbações respiratórias graves. Outra forma importante a ser considerada é a neuroesquistossomose. Já foram encontrados ovos de *S. mansoni* em praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo humano.

Atualmente existem duas principais drogas utilizadas no tratamento da esquistossomose que são: a oxamniquina (OXA) e o praziquantel (PZQ). O PZQ é a droga indicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento em larga escala da esquistossomose (Rollemberg, 2008).

2.4 Exame clínico na avaliação da esquistossomose

Com relação à avaliação do tamanho dos órgãos abdominais, o conhecimento semiológico clássico afirma que o fígado pode ou não ser palpado ao exame físico, independentemente da presença de doença. Nos casos em que o fígado é palpável, as características de suas bordas, superfície e consistência seriam os determinantes clínicos da presença de doença. Já em relação ao baço, sabe-se que este só é palpável em condições patológicas. Assim, um baço palpável já teria atingido duas ou três vezes o seu tamanho normal (Souza, 2004).

Mesmo em áreas endêmicas para esquistossomose, o aumento dos órgãos abdominais nem sempre pode ser atribuído somente a esta condição, o que determina a necessidade de recursos adicionais para o diagnóstico, como por exemplo a ultrassonografia.

2.5 O uso da ultrassonografia na esquistossomose

A ultrassonografia (US) constitui um método de diagnóstico por imagem que, foi introduzido na década de 70, para o diagnóstico da esquistossomose (Abdel-Wahab *et al.*, 1978). Além de informações de alterações hepatoesplênicas, a US também inclui o estudo do sistema porta, a medida do calibre das veias principais, a observação de sua luz e pesquisa circulação colateral.

Vários estudos demonstraram a importância da US no diagnóstico da fibrose periportal e com capacidade de classificar os pacientes em diferentes graus de fibrose hepática (Homeida *et al.*, 1988; Abdel-Wahab, 1992). A classificação ultrassonográfica foi comparada com a classificação clínica, estudos hemodinâmicos e biópsia hepática em muitos estudos realizados em vários países da África. Foi observado que este é um método bastante sensível e reprodutível no diagnóstico da fibrose hepática (Homeida *et al.*,1988; Homeida *et al.*, 1988; Doehring-Schwerdtfeger, 1995).

Ultrassonografistas especialistas em esquistossomose da Organização Mundial de Saúde (OMS) e epidemiologistas de várias partes do mundo, reuniram-se na cidade do Cairo (Egito) e discutiram a aplicação da ultrassonografia na esquistossomose e unificaram o sistema de classificação proposto por Abdel-Wahab *et al* (1992) (Cairo Working Group 1992; Jesus 2000) onde o grau de fibrose hepática foi determinado pela média da medida de 3 espaços periportais após a primeira divisão dos ramos esquerdo e direito da veia porta, sendo assim classificado em grau 0, quando é < 3 mm de

espessura, grau I de 3-5 mm, grau II > 5-7 mm e grau III > 7mm de espessura (OMS, 1993).

Essa classificação foi utilizada para classificar pacientes hospitalizados portadores de esquistossomose no Egito, onde o aumento do diâmetro da veia porta se correlacionou com a forma avançada da doença. Foi observado grandes diâmetros da veia esplênica, porta e vasos sanguíneos colaterais associados com o aumento da espessura dos espaços portais. Além disso o grau de varizes de esôfago, determinadas por endoscopia, foi altamente correlacionado com o grau de fibrose periportal (Doehring-Schwerdtfeger, 1995).

Estudos realizados no Sudão por Homeida *et al* (1988), aplicando a ultrassonografia em pacientes infectados por *S. mansoni*, detectaram alto índice de morbidade em crianças e adultos devido a esquistossomose em duas aldeias, onde os sinais de fibrose hepática estavam presentes em 40% dos pacientes. Eles observaram também que a presença de esplenomegalia, determinada pelo exame clínico, está associada aos graus mais avançados de fibrose pela ultrassonografia, tendo a maioria dos pacientes uma maior intensidade de infecção. Nesse estudo o exame clínico foi considerado limitado como indicador de lesão hepática pela esquistossomose.

Bennett *et al* (1988), estudando o uso de ultrassonografia em pacientes esquistossomóticos no Sudão, identificaram que tratava-se de uma técnica mais sensível que o exame clínico.

No Brasil, os trabalhos que iniciaram a utilização da ultrassonografia em esquistossomose foram realizados em 1984 por Cerri *et al*.

Se por um lado o aumento de órgãos abdominais, especialmente do baço, tem

correlação com as formas mais avançadas, como a fibrose do fígado e o desenvolvimento de circulação colateral (Cota, 2002), por outro lado, a fibrose de Symmers já foi identificada em pacientes que não apresentavam aumento do baço em estudos de autópsias, biópsias e ultra-som (Cota *et al.*,2006; Lambertucci *et al.*, 1996; Lambertucci *et al.*, 2001; Prata; Andrade,1963). Estudo realizado numa área endêmica da Bahia demonstrou o valor do método ultrassonográfico para classificação da fibrose hepática na esquistossomose, demonstrando que havia uma correlação direta entre a espessura do espaço periportal utilizada como principal parâmetro na classificação de fibrose hepática pela US com parâmetros conhecidos de hipertensão portal como o diâmetro da veia porta e o tamanho do baço. Além disso, mostrando que há uma correlação direta entre o diâmetro da veia porta e tamanho do baço. Neste estudo, foi demonstrado também aumento das medidas em 19 indivíduos e progressão da fibrose hepática em 12 de 21 indivíduos que não foram tratados após um ano da primeira avaliação ultrassonográfica e uma regressão da fibrose em 27 dos 39 indivíduos avaliados após tratamento com praziquantel. Estas alterações não foram evidenciadas no exame clínico, reforçando a alta sensibilidade do método ultrassonográfico (Jesus, 2000)

Os critérios de Niamey para a ultrassonografia na avaliação de esquistossomose, foram resultantes do segundo Work Shop Internacional, que ocorreu em 1996 na cidade de Niamey, no Niger. Essa padronização classifica os pacientes em 6 grupos, de acordo com o aspecto visual do parênquima hepático, medida dos espaços periportais, tamanho do fígado, do baço e outras anormalidades, como: Grupo 1 (Nenhum sinal de fibrose periportal), Grupo 2 (Fibrose periportal incipiente não excluída), Grupo 3 (Fibrose periportal possível), Grupo 4 (Fibrose periportal provável), Grupo 5 (Fibrose periportal), Grupo 6 (Fibrose periportal avançada) e grupo 7 (Fibrose periportal

avançada + hipertensão portal).

2.6 Resposta imune na esquistossomose

Os mecanismos de resposta imune nas infecções parasitárias por agentes multicelulares são múltiplos devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitos, que são antigenicamente complexos. Um problema adicional é que estes podem sobreviver por muitos anos no hospedeiro, como resultado dos mecanismos de escape descritos anteriormente (Item 2.1).

A esquistossomose é uma das helmintíases mais bem estudadas em relação aos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência à re-infecção, bem assim, na patogênese da doença.

2.6.1 Mecanismos imunológicos associados à resistência à infecção

Na infecção por *Schistosoma mansoni*, espécie do parasito encontrado no Brasil, a primeira forma do ciclo encontrada na pele após a penetração das cercárias na pele, o esquistossômulo pode ser destruído por diferentes mecanismos imunológicos: ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) com participação de IgE e IgG 2a e de células como eosinófilos e macrófagos. Porém, macrófagos ativados por IFN- γ e produtores de NO foram descritos em camundongos como importantes para a destruição de esquistossômulos nos pulmões. No homem, estudos *in vitro* mostram que anticorpos IgE e células como eosinófilos, e macrófagos podem destruir os esquistossômulos. Contudo, as principais evidências da existência de imunidade protetora ao *S. mansoni* têm sido baseadas em estudos epidemiológicos, que demonstram uma diminuição da prevalência e da intensidade da infecção em indivíduos com faixa etária mais elevada, a despeito da existência do mesmo grau de exposição à água contaminada. Estudos

imunológicos realizados em áreas endêmicas de esquistossomose no Brasil (Bahia e Minas Gerais) e na África (Kênia) mostram a existência de indivíduos com maior resistência à re-infecção (Butterworth *et al.*, 1985, Butterworth *et al.*, 1987, Dunne *et al.*, 1992, Ribeiro de Jesus *et al.*, 2000, Viana *et al.*, 1994, Viana *et al.*, 1995). Esses indivíduos apresentam uma maior produção de anticorpos IgE, ou valor mais elevado da relação IgE/IgG4 e também maior resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ aos antígenos de verme adulto (SWAP) e de esquistossômulo (ESQUIST ou CERC). Esses dados sugerem que tanto a resposta Th1 como Th2 estejam envolvidas na proteção contra a re-infecção.

Como o ciclo de vida do parasito é complexo, e várias formas do ciclo evolutivo podem ser encontradas nos tecidos do homem, pode ser que estes mecanismos atuem em locais diferentes. Por exemplo, na pele a destruição de esquistossômulos pode ser mediada por IgE e eosinófilos, enquanto nos pulmões por macrófagos ativados por IFN- γ , produtores de óxido nítrico (NO) como é demonstrado em camundongos.

2.6.2 *Imunopatogênese da esquistossomose aguda*

Na fase aguda da esquistossomose as manifestações clínicas são exuberantes e assemelham-se a sepsis, com a presença de febre, astenia, perda de peso, dor abdominal, diarreia e tosse, além de complicações como insuficiência ventilatória restritiva, pleurite e pericardite. Nestes pacientes foram detectadas citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), mesmo em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sem estímulo com antígenos. Foram também detectados complexos imunes circulantes. Foi observada uma associação entre TNF- α no soro com perda de peso e dor abdominal, e a presença de achados radiológicos de infiltrado intersticial e pericardite com a presença de imunocomplexos circulantes (Jesus, 2002).

2.6.3 Imunopatogênese da fase crônica da esquistossomose

Alguns meses após a fase aguda, os pacientes tratados ou não, tornam-se assintomáticos, e evoluem para a forma crônica da doença (Carvalho; Andrade, 2005). As formas crônicas são mais prevalentes e mais associadas à morbidade em áreas endêmicas.

A patogênese da forma crônica da doença resulta da resposta imune do hospedeiro aos ovos depositados pelo *Schistosoma mansoni*, principalmente no sistema venoso portal (Warren, 1975). A formação de granulomas ao redor desses ovos e a fibrose associada, leva ao surgimento de hipertensão portal, responsável pela morbimortalidade da doença (Jesus, 2000), esplenomegalia, varizes de esôfago e sangramentos recorrentes (Bina, 1990).

Em camundongos, a formação do granuloma inicia com a deposição de ovos no sistema vascular portal e atinge o pico inflamatório 8 semanas após a infecção. Durante essa fase a reação tem sido caracterizada como reação de hipersensibilidade dependente de células T CD4+. O granuloma representa a lesão básica da esquistossomose, e nele há um componente que atua como um corpo estranho, que seria a casca quitinosa do ovo. Mas o que é mais importante na formação do granuloma é a interação das secreções do miracídio com o sistema imune do hospedeiro. Nestas secreções o fator antigênico e sensibilizante mais importante é o antígeno ovular solúvel (SEA). As secreções ovulares provocam uma reação inflamatória, que evolui para uma estrutura granulomatosa (Carvalho; Andrade, 2005).

Inicialmente é uma lesão predominantemente celular, exsudativa, grande, de limites irregulares, e geralmente centrada num foco de necrose. Após a fase aguda da doença, o granuloma diminui o tamanho, pois diminui a inflamação, por

imunomodulação. Nesta, linfócitos TCD4⁺ específicos e ativados secretam citocinas que promovem a regulação do granuloma, a IL-10 desempenha papel importante neste mecanismo, mas em modelos experimentais o TGF- β e IL-12 também estariam envolvidos neste processo. Posteriormente, as células presentes no granuloma secretam citocinas fibrogênicas como: IL-1, TNF- α , FGF (fator de crescimento para fibroblastos), TGF- β e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas). Elas estimulam a atividade fibroblástica, levando a proliferação de células capazes de sintetizar colágeno, como macrófagos, fibroblastos e hepatócitos (Carvalho; Martins; Oliveira, 2008).

É bem conhecido que a imunopatologia da infecção por *S. mansoni* é devido a um tipo de hipersensibilidade retardada granulomatosa ao redor do parasito aprisionado no tecido do hospedeiro. Esta resposta, contudo, é regulada na doença progressiva de uma fase aguda para crônica, com um decréscimo característico da resposta imune aos antígenos derivados do ovo.

Pearce e cols. sugeriram que nas fases iniciais da infecção há uma predominância da resposta Th1, que seria induzida por antígenos do esquistossômulo, enquanto que após a oviposição há um predomínio da resposta Th2. Assim, acredita-se que essa reação granulomatosa seja devido a uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células Th2, bem demonstrado pela presença de eosinófilos nas lesões e produção de anticorpos IgE e IgG4 na fase crônica da esquistossomose. Em muitos sistemas *in vitro*, IL-4 tem sido considerado um sinal obrigatório para o desenvolvimento de células Th2, no entanto, camundongos geneticamente deficientes de IL-4 podem conservar a habilidade para montar uma resposta imunopatológica ao *S. mansoni*.

Tem sido demonstrado que a produção de IL-4 ocorre durante os dois primeiros dias da formação do granuloma enquanto que IFN- γ é produzido após 4 ou 8 dias da infecção em camundongos. A administração de anti-IL-4 e anti-IL-12 reduziram o tamanho de granulomas pulmonares após a injeção de ovos de *S.mansoni*, enquanto que o tratamento com anti-IFN- γ não alterou o tamanho do granuloma, mas induziu a uma redução do número de células gigantes. Já o tratamento com anti-IL-10 inicia um aumento no tamanho do granuloma.

Num trabalho de Cheever *et al.* foi demonstrado uma redução do tamanho dos granulomas em camundongos infectados por *S. japonicum* quando tratados com anticorpo anti-IFN- γ . Rezende *et al.* reforça também o papel do IFN- γ em experimentos utilizando camundongos mutantes desprovidos de IFN- γ , nos quais houve uma redução no tamanho dos granulomas e uma diminuição significativa do número de células inflamatórias em relação a camundongos selvagens, sugerindo ainda que a produção de IFN- γ durante a fase inicial da resposta imune na infecção por *S. mansoni* é essencial para a formação de granulomas hepáticos.

Foi demonstrado também que IL-13 possui 30% de homologia com IL-4 e que as duas citocinas teriam atividades biológicas semelhantes. Essa semelhança seria devido a presença de cadeia α do receptor de IL-4 em ambos os complexos de receptores, além do fato de compartilharem a mesma via de sinalização STAT 6. Fallon *et al.* demonstraram que a reação granulomatosa pulmonar é parcialmente diminuída em camundongos nocaute de IL-13 ou IL-4 em relação aos camundongos selvagens com diminuição da infiltração de eosinófilos, produção de IgE e citocinas Th2 (IL-5 e IL-10). Em contraste, essa resposta foi abolida no camundongo deficiente de ambas as citocinas IL-4 e IL-13 com predominância da resposta imune tipo Th1 (IFN- γ) Esses

dados mostram que estas citocinas tipo 2, são as principais envolvidas na formação do granuloma. A ausência de apenas uma destas citocinas não abole a formação do granuloma porque elas partilham do mesmo receptor e exercem funções superponíveis.

Adicionalmente, alguns estudos empregando camundongos deficientes de IL-4, STAT 6 ou IL-4 R α , sugeriram que IL-13 parece ter um papel independente na resposta a infecções helmíntica. Fallon *et al.* demonstraram que camundongos nocaute de IL-13 apresentam maior sobrevida após a infecção por *S. mansoni*. Essa melhora no prognóstico se correlacionou com uma redução na deposição de colágeno e diminuição da fibrose hepática indicando um papel de IL-13 no desenvolvimento da fibrose hepática. Mais recentemente, Chiaramonte *et al* demonstraram um papel direto da IL-13 no desenvolvimento da fibrose hepática durante a esquistossomose murina. Animais deficientes de IL-4 possuem níveis normais de deposição hepática de colágeno. Em contraste a remoção de IL-4 resulta em um aumento da mortalidade, correlacionando com uma quebra da integridade intestinal, e morte por diarreia e “wasting syndrom”, implicando em um papel protetor de IL-4 à infecção por *S. mansoni* por reduzir a inflamação intestinal. Os aspectos clínicos deste camundongo foram comparáveis aos dos pacientes com esquistossomose aguda. Em camundongos deficientes de IL-4 e IL-13 observou-se também um aumento da mortalidade, demonstrando que os efeitos positivos resultantes da ablação de IL-13 foram sobrepujados pelos efeitos da remoção de IL-4. Além disso, observou-se a remoção de IL-13 e IL-4 foi relacionado com maior mortalidade do que a remoção apenas de IL-4.

Em mais um trabalho desenvolvido por Chiaramonte *et al.* em 2000, infectando as linhagens de camundongos (C3 H / HCN ; BALB / C e C57BL /6) com *S. mansoni*, ele observou que IL-13 é requerida em qualquer estágio de infecção para induzir

fibrose, embora haja uma variabilidade na resposta fibrogênica, onde estes podem desenvolver alto, intermediário ou baixos níveis de fibrose, respectivamente. O alto ou baixo respondedor não teve relação com os eosinófilos ou mastócitos no tecido, mas se associaram com altos níveis de IL-13 e baixos níveis de mRNA para IFN- γ e IL-10. Esses estudos demonstram um papel central da IL-13 na fibrogênese em camundongos.

Recentemente, foi observado que camundongos portadores de fibrose esquistossomótica grave apresentavam lesões dependentes da presença de IL-23 e IL-17. A IL-17 é produzida pelas células Th-17, cuja diferenciação depende da presença de IL-6, TGF- β e IL-23, através da indução do fator de transcrição ROR γ t.

No homem, ainda existem várias lacunas nos mecanismos imunes envolvidos na formação do granuloma, na sua modulação e na fibrose resultante. Sabe-se que a carga parasitária elevada contribui para o desenvolvimento das formas graves da doença e a terapêutica com drogas esquistossomicidas reduziu a prevalência de formas hepatoesplênicas da doença (Sleigh, 1985; Bina, 1981; Bina, 1995). Tem sido observado que a susceptibilidade do homem para desenvolver fibrose de Symmers está relacionada com intensidade e duração da infecção, embora seja também demonstrado que a predisposição genética também seja importante para a patogênese da doença. A predisposição genética é demonstrada por uma associação entre raça branca e maior gravidade da doença hepatoesplênica, bem como associação de alelos HLA classe II (DQB 0201, DRB1 (0901 e 1302) e DQB1 (0303 e 0609) com o desenvolvimento de fibrose ou de doença hepatoesplênica (Secor, 1996). Em contraste, a presença dos alelos HLA – DRB1 1501 e HLA – DQB1 0601 foi associado com resistência à doença.

A influência da resposta imune na indução e modulação das lesões granulomatosas e desenvolvimento das formas graves da esquistossomose são

dificultadas no homem por diversos motivos. O caráter evolutivo gradual das lesões, a possível existência de mecanismos distintos na formação do granuloma, na sua modulação, bem como na indução da fibrose são alguns fatores que dificultam a interpretação dos estudos avaliando a imunopatologia nas diferentes formas clínicas da esquistossomose. Colley *et al.*, em área endêmica de Minas Gerais, comparam a resposta imune de pacientes hepatoesplênicos hospitalizados e hepatoesplênicos de ambulatório com pacientes que apresentam as formas crônicas intestinal e hepatointestinal e com a forma aguda da doença frente a três antígenos do parasito, antígeno de verme adulto (SWAP), antígeno de ovo (SEA) e antígeno solúvel de cercária (CERC). Eles observaram uma grande variabilidade na resposta linfoproliferativa a esses antígenos com pacientes não respondedores, com resposta moderada e altos respondedores aos três antígenos, sendo que mais de 50% dos pacientes hepatoesplênicos hospitalizados não responderam a SEA, com uma resposta substancial a SWAP, enquanto nos pacientes hepatointestinais e hepatoesplênicos de ambulatório (fase menos grave da forma hepatoesplênica), foi observado um grande percentual de alto respondedores a SEA. Diante dessas observações, esses autores sugerem que no início da infecção por *S. mansoni* todos os pacientes têm uma resposta direcionada aos componentes do ovo de *Schistosoma* e, subsequentemente, muitos pacientes regulam de alguma forma essa resposta expressando moderada e baixa resposta ao antígeno de ovo do parasito. Entretanto, alguns indivíduos não desenvolvem mecanismos imunoregulatórios adequados para controlar a alta resposta a esses antígenos.

Em área endêmica da Bahia, Jesus *et al.* avaliou a resposta proliferativa de pacientes esquistossomóticos crônicos aos diferentes antígenos de *S. mansoni* e demonstrou que esses indivíduos têm uma baixa resposta proliferativa ao antígeno de

verme adulto (SWAP) e ausência de produção de IFN- γ . Araújo *et al.* também demonstraram a ausência da produção de IFN- γ e a presença da resposta predominantemente Th2 nos indivíduos com a forma crônica intestinal e hepatointestinal de área endêmica. Mawatha *et al.* realizou um estudo caso-controle comparando a resposta imune de indivíduos hepatoesplênicos com não hepatoesplênicos, classificados por exames clínicos, pareados por idade e grau de infecção em duas áreas endêmicas da África. A avaliação dos níveis de citocinas em sobrenadantes de PBMC estimuladas com antígenos de ovo (SEA) bem como níveis séricos de citocinas mostraram níveis mais elevados de TNF- α e IFN- γ em sobrenadantes de PBMC de hepatoesplênicos, bem como níveis séricos mais elevados de ICAM-1 solúvel e de receptores solúveis de TNF tipos I e II, além de níveis mais baixos de IL-5 quando comparados com indivíduos não-hepatoesplênicos. Esses dados sugerem que, ao contrário do que é demonstrado em camundongos, no homem a resposta Th1 foi mais evidenciada em indivíduos com a forma hepatoesplênica da doença. No entanto, estes indivíduos hepatoesplênicos eram provenientes de área endêmica de malária, dificultando a interpretação dos dados, pelo problema da classificação clínica por exame físico com a esplenomegalia causada pela malária. Além disso, infecção por Malária, mesmo tratada, pode ser a responsável pelos níveis elevados de TNF- α . Estudo mais recente do mesmo grupo, avaliando indivíduos co-infectados por *S. mansoni* e *Plasmodium falciparum*, sugere que a falta de modulação da resposta ao antígeno de ovo (SEA) poderia ser responsável pela esplenomegalia. Nesse estudo também foi encontrada uma relação entre esplenomegalia e os níveis de TNF- α , porém, estes achados podem ser decorrentes também da infecção por Malária (Wilson *et al.* 2008). Em outros estudos, foi observada uma associação entre níveis

baixos de Interferon Gama (IFN- γ) e fibrose periportal (Barbosa *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 2002).

O IFN- γ (interferon gama) é produzido por células da resposta imune inata, como células NK e macrófagos, e células da resposta imune adaptativa, como linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. O IFN- γ é o principal ativador de macrófagos. O IFN- γ juntamente com a IL-12 favorece a diferenciação das células T CD4 em Th1. Altos níveis são expressos por células Th1, ativando os macrófagos para matar micróbios, promovendo atividades citotóxicas de outras células, e induzindo a apoptose das células epiteliais da pele e mucosas. Além de seu papel no desenvolvimento da resposta Th1 e do isotipo de células B de comutação de IgG2a, o IFN- γ regula a expressão da proteína MHC classe I e II e a apresentação de antígenos. O IFN- γ também inibe o crescimento celular e a apoptose, e ainda controla a extensão da resposta imune. Ele estimula a inflamação rica em macrófagos e inibe os processos inflamatórios ricos em eosinófilos. Na total ausência de expressão do receptor de IFN- γ , a formação de granulomas é reduzida. (Akdis, 2011; Murphy, 2010).

Diante do conhecimento de que a forma hepatoesplênica se desenvolve lentamente no indivíduo infectado, com alterações patológicas relacionadas à evolução da fibrose hepática, e de que existe uma imunorregulação exercida pelas citocinas nas diferentes formas clínicas da doença, há uma necessidade de se estudarem as respostas imunes presentes em estágios mais precoces de evolução da lesão e das fases mais avançadas, no intuito de entender todas as fases de desenvolvimento da forma grave da doença. Jesus *et al* (2004) estudou as etapas iniciais da fibrose hepática, classificando em graus de fibrose de acordo com a classificação de Abdel Awab, demonstrando uma crescente produção de citocinas tipo Th2 (IL-5, IL-13 e IL-10) quando compararam os

pacientes de grau I, grau II e grau III de fibrose. Esta resposta foi evidenciada apenas ao antígeno de ovo (SEA) e não de vermes adultos (SWAP). Além disso, evidenciaram em pacientes que apresentaram um aumento do grau de fibrose em 6 meses sem tratamento um aumento da produção de citocinas Th2 (IL-5 e IL-13) e TGF- β .

As citocinas produzidas durante a indução da resposta Th2 inclui IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33; estas medeiam a imunidade contra infecções por helmintos, a produção de IgE, e eosinofilia. A IL-5 foi inicialmente descrita como um factor crescimento para eosinófilos e células B. É produzido principalmente por células CD4+ Th2, eosinófilos ativados, mastócitos, células CD8+Tc2, células T NK e células da placa de Peyer. IL-5 promove a proliferação, ativação, diferenciação, sobrevivência e adesão de eosinófilos.

Camundongos com deficiência IL-5 apresentam seu desenvolvimento normal, reduzem a expulsão de *Nippostrongylus brasiliensis*, e têm menos células IgA1 na lâmina própria comparado com o camundongo controle mas são resistentes à indução experimental de asma (Akdis, 2011).

Estudos em modelos murinos sugerem que a patogenia da fibrose portal na forma hepatoesplênica depende de uma sequência de eventos vasculares intra-hepáticos num animal com carga parasitária muito alta. A falha de controle de um desses eventos pode favorecer a uma fibrose mais intensa, inicialmente com o rompimento de pequenos vasos portais periféricos devido ao grande número de ovos embolizados nesta região, que podem desencadear um processo inflamatório, angiogênese e fibrose (Silva, 2003; Carvalho; Andrade, 2005).

Como mencionado acima, a fase inicial da formação do granuloma e fibrose hepática em camundongos também está associada a uma resposta Th2 (IL-4 e IL-13).

No entanto, dados de estudo realizado com camundongos revelaram um papel crítico da IL-17 na imunopatologia da esquistossomose e que as células Th17 são estimuladas pela IL-23 (Stadecker, 2005). Outro estudo realizado com camundongos, pelo mesmo grupo, mostrou que animais de espécies diferentes, nas mesmas condições ambientais e cargas parasitárias semelhantes podem apresentar desfechos diferentes, como por exemplo, inflamação granulomatosa hepática com grau de intensidade diferente. A imunopatologia grave corresponde a um aumento da citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17, que são os produtos da Th1 e Th17 subconjuntos de células T CD4 +, respectivamente. Destes, o subconjunto Th17 é um marcador mais provável de doença grave (Stadecker, 2009).

A primeira subpopulação de células T efetoras a ser gerada em resposta à infecção é frequentemente as células Th17. Uma vez encontrado o patógeno, a primeira resposta da célula dendrítica é sintetizar IL-6 e TGF- β . Na ausência de IL-4, IFN- γ , ou IL-12, estas citocinas induzem as células T virgens a diferenciarem-se em células Th17 e não em Th1 ou Th2. (Murphy, 2010). IL-17A, inicialmente chamada de IL-17, é membro fundador de uma família estruturalmente distinta de citocinas. Ele se liga como um homodímero ou como um heterodímero com a IL-17F ao seu receptor, 17RA. A IL-17A é expressa por ativação de Th17, mas sua expressão também tem sido detectado em células NK, e neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais, em células endoteliais, células B e T, células mielomonocíticas e células do estroma da medula óssea. Durante a diferenciação para Th17, as células T virgens humanas devem ser expostas a IL-1b, IL-6, IL-23 e TGF- β , antes delas expressarem os níveis máximos de IL-17. O 17RA é expresso no pulmão, baço, rim e fígado. Consiste em uma ampla expressão do receptor de IL-17A em uma variedade de células, que respondem pela regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mieloproteases. Um importante papel da IL-

IL-17 nos locais de infecção é induzir células locais a secretarem citocinas e quimiocinas que atraem neutrófilos para mediar as defesas contra patógenos diferentes (Akdis, 2011; Murphy, 2010). Assim, torna-se mandatória a realização de estudos na espécie humana para entender o papel da IL-17 na patogênese da esquistossomose mansônica crônica.

Dessa forma, o presente estudo tem **o objetivo principal** de avaliar os fatores socioeconômicos, educacionais e culturais envolvidos na gravidade da infecção, e a resposta imune envolvida tanto nos estágios iniciais da fibrose hepática como nas fases mais graves da fibrose com hipertensão portal. Isto foi realizado através de inquérito clínico, epidemiológico e coproparasitológico, classificação dos pacientes por ultrassonografia, visando identificar marcadores imunológicos associados tanto aos eventos iniciais da lesão hepática como nas fases mais tardias da doença. Também conhecida como Fibrose Symmers, a forma hepatoesplênica está presente em cerca de 2 a 7% dos pacientes infectados de área endêmica, assim, a inclusão de indivíduos recrutados de outras áreas endêmicas e atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS) foi necessária para analisar estágios mais avançados da doença (Mesquita, 2004).

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar os Fatores Sócioeconômicos, ambientais e imunológicos associados à esquistossomose mansônica crônica.

3.2 Específicos:

1. Avaliar a morbidade da esquistossomose em uma área de alta prevalência da doença, através de exames parasitológico, clínico e ultrassonográfico (US) e verificar suas relações com os aspectos socioeconômicos, educacionais e a exposição com os hídricos da Região.
2. Relacionar a intensidade da infecção (carga parasitária: número de ovos /grama de fezes) com as citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17 produzidas por células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos estimuladas por antígenos de *S. mansoni* (SWAP e SEA).
3. Relacionar a gravidade da doença (grau de fibrose e formas clínicas) com as citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17 produzidas por células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos estimulados por antígenos de *S. mansoni* (SWAP e SEA).

4. Metodologia

4.1 Área de estudo

A área selecionada para estudo foi a cidade de Ilha das Flores que está situada no norte do estado de Sergipe, na divisa com o Estado de Alagoas, às margens do Rio São Francisco. Essa área foi selecionada com base nos dados do programa de controle de esquistossomose (PCE) da secretaria de saúde do estado de Sergipe dos anos 2006 e 2007, onde verificamos uma alta frequência de positividade do EPF (exame parasitológico de fezes). Ilha das Flores é situada entre os municípios de Brejo Grande e Pacatuba, às margens do Rio São Francisco. Por ocupar uma área da bacia do São Francisco, que compreende a maior bacia hidrográfica do estado, há abundância no local de muitos córregos, lagos, poços e áreas de alagadiços. Além disso, um sistema de irrigação criado pela CODAVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba) e cultivo do arroz leva a população a uma exposição obrigatória à água (relacionada às suas atividades laborais). De acordo com dados do IBGE de 2007, Ilha das Flores possui 8.598 habitantes, desses 85,35% possui água encanada e apenas 3,30% da população urbana possui cobertura do sistema de esgotamento sanitário. Apesar de existir fornecimento de água para os bairros, esse é irregular, além de não atingir todas as residências da cidade, sendo as fontes naturais de água largamente utilizadas pelos moradores para os mais variados fins: agricultura, pesca, banho, lavagem de roupas, lavagem dos animais. Nas áreas alagadas e lagoas, foram identificados criadouros naturais do hospedeiro intermediário da esquistossomose, o caramujo da espécie *B. glabrata* e *B. straminea*. Segundo o PCE, no ano de 2007 foram realizados 1057 exames parasitológicos, com positividade em 491 testes (frequência de

46,45%), distribuídos da seguinte forma: 227 pessoas de 0-4 anos, 149 pessoas de 5-16 anos e 115 pessoas acima de 17 anos.

4.2 Desenho do estudo, seleção e tamanho da amostra a ser estudada

Para esta pesquisa foi utilizado um modelo de estudo transversal.

Com base nos dados do PCE de 2007, o município tem uma frequência de infecção por *S. mansoni* de 46,45% e a população a ser estudada para representar o município de Ilha das Flores foi calculada utilizando a equação $n = pqz^2/d^2$ (onde: n = tamanho da amostra; p = prevalência esperada (46,5%); q = 1 - p; z = 1,96; d = 5%) o tamanho amostral obtido foi 380 indivíduos. Além disso, utilizou-se o software Stata 7.0 para calcular o intervalo de confiança binominal, utilizando-se como prevalência esperada 40%, obtendo-se para um n = 500 um intervalo de confiança 95% (IC 95%) de 35,7 - 44,4%. O tamanho amostral escolhido foi 500 indivíduos. Esses 500 indivíduos foram definidos através de uma seleção aleatória de 100 casas ou Famílias (média estimada de 5 pessoas/casa), distribuídas proporcionalmente nos povoados que compõem o município de Ilha das Flores (a sede da cidade (43% das casas)) e os povoados Bongue (6%); Serrão (25%); Bolivar (14%); os demais povoados apresentavam números inexpressivos. Como na área endêmica de Ilha das Flores existiam apenas 8 indivíduos com a forma HE, foram incluídos no estudo mais 19 indivíduos recrutados do Hospital Universitário em atendimentos ambulatoriais do serviço de gastrohepatologia.

4.3 Inquérito clínico epidemiológico e coproparasitológico

As pessoas selecionadas foram visitadas pela equipe de pesquisadores, onde foram informados dos objetivos da pesquisa, e logo após assinaram o termo de

consentimento livre e esclarecido (TCLE – **Apêndice 1**), responderam a um inquérito clínico epidemiológico, e submeteram-se à coleta de sangue, exame clínico e coproparasitológico.

O inquérito apresentava questões demográficas como idade, endereço, raça, gênero, ocupação: educacionais como o grau de escolaridade, renda familiar, condições sanitárias como água encanada, tipo de esgotamento, atividades que exercem em contato com águas superficiais e tempo de contato; hábitos de vida, a exemplo de tipo de água que bebe, hábito de lavar os alimentos e andar descalço; aspectos clínicos como queixas de diarreia, muco e sangue nas fezes e exame do fígado e baço; entre outros aspectos que não foram analisados neste trabalho (**Apêndice 2**).

4.3.1 Exame Clínico

Nos exames clínicos, os médicos da equipe, realizaram apalpações do fígado e baço, onde eram assinalados como impalpável ou palpável no rebordo costal ou abaixo do rebordo costal, com medidas relatadas em centímetros.

A classificação clínica empregada foi a de Pessoa & Barros, 1953 (Castro, 2009). O paciente que apresentou o parasitológico positivo para *Schistosoma mansoni*, e no exame clínico apresentou o fígado e o baço palpáveis, sem inspiração, foi considerado portador da forma hepatoesplênica (HE). O paciente que apresentou o parasitológico positivo para *Schistosoma mansoni*, e apenas o fígado palpável no apêndice xifóide com tamanho ≥ 4 cm (aumento do lobo esquerdo e baço não palpável) foi considerado portador da forma hepatointestinal (HI) e os pacientes com o parasitológico positivo e fígado palpável < 4 cm no Apêndice Xifóide (AX) e baço impalpável foi considerado portador da forma Intestinal (I) (Bina JC e Prata A., 2003).

4.3.2 Exame coproparasitológico.

Os exames de fezes foram realizados pelo método qualitativo (TF-Test®) e quantitativo de Kato Katz (Katz *et al.*, 1972).

As amostras de fezes foram processadas no mesmo dia da entrega por agentes de saúde da área endêmica, que foram retreinados por membro da equipe.

No presente estudo foram analisadas 3 amostras do TF test® que é um exame qualitativo e uma amostra, com confecção de 3 lâminas pelo método de Kato-Katz,, sendo o resultado calculado pela média de ovos encontrados nessas lâminas. No Kato-Katz, o número de ovos encontrados no esfregaço fecal foi multiplicado pelo fator de conversão 23 como recomendado pelo teste, correspondente ao número de ovos por gramas de fezes. Este método mede a carga parasitária ou o grau de infecção.

Classificamos a carga parasitária com os critérios da OMS (WHO, 1985). Que estabelece que existam três categorias para a intensidade da infecção intestinal (expressas em ovos por gramas de fezes) nas quais se considera: leve (23 - 100 ovos por grama de fezes), moderado (101 - 400) e grave (> 400).

4.3.3 Definição do grau de contato com águas naturais

O grau de contato com a água contaminada foi avaliado utilizando os critérios de Dessain e cols (1988), com base nas informações obtidas no inquérito clínico epidemiológico. Este define Grau O (nenhum contato), Grau I (contato inferior a 1 hora por semana), Grau II (contato entre 1 e 6 horas por semana) e Grau III (contato maior que 6 horas semanais).

4.4 Georreferenciamento das casas participantes do estudo utilizando Sistema de informação geográfica (SIG)

Todos os procedimentos referentes ao Sistema de Informação Geográfica (SIG) foram realizados pelos colaboradores do projeto o Dr. José Antônio Pacheco de Almeida (professor do Departamento de Geografia da UFS) e toda sua equipe. A construção do Banco de Dados Georeferenciado (BDG) contendo as informações espaciais foram realizadas no Sistema de Informações Geográficas (SIG).

Na Base cartográfica das referidas fotografias aéreas foram mapeadas a malha urbana, contendo os lotes, casas e ruas da sede municipal (Ilhas das Flores) e dos povoados Bongue, Serrão, Bolival e as fontes hídricas,

Os resultados do inquérito clínico de toda a população, seguido de exame parasitológico pelo método quantitativo de Kato-Katz. e classificação das formas clínicas da doença foram espacializados na base cartográfica. Com base no BDG foram realizadas consultas espaciais e geração de mapas visando a identificação das áreas de maiores prevalências e maior gravidade dos casos. O geoprocessamento das informações foi feito na plataforma SPRING 5.0 (Sistema de Processamento de Informações Georeferenciadas).

4.5 Ultrassonografia

Foi realizada em uma amostra dos pacientes que apresentavam exame parasitológico positivo (n = 78) e nos 19 pacientes hepatoesplênicos do HU. Os pacientes selecionados foram conduzidos ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, e foram submetidos ao exame de ultrassonografia abdominal, para avaliação de fígado e baço. Foi empregado o método definido pela OMS na reunião de

Niamey, 2000. Todos os exames foram realizados pelo mesmo profissional e no mesmo aparelho, marca Medison, modelo: Sonoace 8000 SE.

A classificação de Niamey inclui também a da OMS, 1993 (Abdel-Wahad *et al.* 1992), com a medida de 4 espaços periportais após a 1 divisão dos ramos direito e esquerdo da veia porta, 2 espaços de cada lado. Essa classifica os pacientes em 6 grupos, de acordo com o aspecto visual do parênquima hepático, medida dos espaços periportais, tamanho do fígado, do baço e outras anormalidades. Grupo 1 (Nenhum sinal de fibrose periportal), Grupo 2 (Fibrose periportal incipiente não excluída), Grupo 3 (Fibrose periportal possível), Grupo 4 (Fibrose periportal provável), Grupo 5 (Fibrose periportal), Grupo 6 (Fibrose periportal avançada) e grupo 7 (Fibrose periportal avançada + hipertensão portal).

4.6 Metodologia do objetivo 01

Objetivo 1 - Avaliar a morbidade da esquistossomose em uma área de alta prevalência da doença, através de exames parasitológico, clínico e ultrassonográfico (US) e verificar suas relações com os aspectos socioeconômicos, educacionais e a exposição com os hídricos da Região.

.Hipótese: A maior gravidade da doença hepática, avaliada pela carga parasitária e formas clínicas está associada a um maior tempo de exposição à água contaminada.

4.6.1 Análises dos dados:

Os resultados do inquérito clínico de toda a população, seguido de exame parasitológico pelo método quantitativo de Kato-Katz e classificação das formas

clínicas da doença foram introduzidos em um banco de dados, utilizando-se o programa EXCELL. Análises dos dados foram realizadas utilizando-se os programas de estatística EpiInfo versão 3.5.1 e GRAPHPAD PRISMA, versão 4.0. Foram calculadas as razões de prevalências e intervalos de confiança 95%, para verificar associações entre variáveis consideradas dependentes como positividade parasitológica, gravidade da infecção medida pela carga parasitária e formas clínicas da doença com diversas variáveis consideradas aqui como independentes, como demográficos (Idade, gênero), profissão, fatores socioeconômicos, educacionais, grau de contato com a água, utilizando o teste exato de Fisher, considerando como significativo estatisticamente um $p < 0,05$.

4.7 Metodologia do objetivo 2.

Objetivo 2 - Relacionar a intensidade da infecção (carga parasitária: número de ovos /grama de fezes) com as citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17 produzidas por células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos estimuladas por antígenos de *S. mansoni* (SWAP e SEA).

Hipótese: Existe uma associação entre citocinas do tipo Th2 (IL-5) e Th17 (IL-17) com a maior intensidade da infecção.

Para atingir este objetivo foi realizada análise dos resultados dos exames parasitológicos, e formados grupos de pacientes classificados em diferentes graus de infecção, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS em 1985, grupo 1 (≤ 100 ovos/g fezes), grupo 2 ($> 100-400$ ovos/g fezes) e grupo 3 (> 400 ovos/g fezes) e coletado o sangue desses pacientes para avaliação imunológica.

4.7.1 Seleção de pacientes e critérios de inclusão e exclusão:

Os pacientes foram selecionados da área endêmica de Ilha das Flores e trazidos ao Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) para realização de exame ultrassonográfico e coleta de sangue para estudo imunológico.

Os **critérios de inclusão** para o estudo imunológico são: ser infectados pelo *S.mansoni*, ambos os sexos, e ter idade entre 2 a 75 anos. Os **critérios de exclusão** são: ser gestante ou portador de condições ou doenças que afetem a resposta imune (resultado positivo para HIV, HTLV-I, Vírus da Hepatite B (AgHBS) e C (Anti-HCV) e diabetes mellitus).

4.7.2 Coleta de sangue

Foram coletados 35 a 45 ml de sangue de cada paciente. Sendo 05 ml para a realização das sorologias e 30 a 40 destinados à avaliação imunológica. Parte do sangue (5 ml) foi colocado em tubo com gel separador (Vacutainer®, SSTTM II Advance, Bacton & Dickson, USA), para separação do soro para realização das sorologias. O restante (30 a 40 ml) foi colocado em tubo contendo heparina 10 UI/ml de sangue para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) que foram utilizadas na realização da avaliação imunológica.

4.7.3 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram fracionadas do sangue heparinizado, segundo método previamente descrito (Jesus, 2000). Sumarizando, O sangue heparinizado foi submetido a um gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Suécia), em uma proporção de 3ml para cada 10 ml de sangue e centrifugação a 1250 rpm por 30 minutos

à 25°C. O anel de células mononucleares foi aspirado da interface e as células lavadas três vezes com solução salina 0,9% a 1500 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em meio de cultura RPMI (RPMI-1640 Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 10% de soro AB Rh-positivo (SIGMA, USA) (Jesus, 1998).

4.7.4 Avaliação imunológica

Após o fracionamento e lavagem, as PBMC foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 3×10^6 células/ml, cultivadas em placas de cultura de células de 24 orifícios (TPP®, Suíça). PBMC sem estímulo ou estimuladas com antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) ou de ovos (SEA) de *S. mansoni*, em concentrações previamente determinadas em outros estudos e testadas com um grupo controle da população de Aracaju, ou com antígeno derivado proteico purificado de micobactéria (PPD, 1 µg/ml) ou com Phitohemaglutinina (PHA, 10 µg/ml) foram incubadas em estufa humidificada, a 37°C, 5% de CO₂. A concentração de 10 µg/ml é geralmente utilizada tanto para SEA como SWAP por induzir resposta em PBMC dos pacientes com esquistossomose e não induzir em controles. Após 72 horas as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados, alíquotados armazenados a -80°C para posterior dosagem das citocinas.

As concentrações das citocinas (IFN- γ , IL-5, IL-17) foram dosadas nestes sobrenadantes pela técnica de ELISA utilizando-se kits comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D systems Inc. Minneapolis, MN, USA) em placas de microtitulação (Kartell S.P.A, Itália), e os resultados expressos em pg/ml com base em uma curva padrão utilizando as citocinas recombinantes.

4.7.5 Análises estatísticas

Associações entre subgrupos de pacientes com graus diferentes de infecção em relação a outras variáveis categóricas como os dados demográficos (Idade, gênero), graus de contato com a água e graus de infecção pelo cálculo das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança 95% (IC 95%). Além disso, as variáveis numéricas, como o número de ovos/g de fezes e as concentrações das citocinas nos sobrenadantes de PBMC, foram comparadas entre estes grupos pelo teste não paramétrico (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunns). Foram também feitas correlações entre variáveis numéricas como número de ovos/g de fezes com as concentrações de citocinas pelo teste de correlação de Spearman. Estas análises foram realizadas utilizando os programas EpiInfo versão 3.5.1 e GraphPad PRISM, versão 4.0. Um valor de $\alpha \leq 5\%$ ($p \leq 0.05$) foi considerado para significância estatística.

4.8 Metodologia do objetivo 3

Objetivo 3. Relacionar a gravidade da doença (grau de fibrose e formas clínicas) com as citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-17 produzidas por células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos estimulados por antígenos de *S. mansoni* (SWAP e SEA).

Hipótese: Existe uma associação entre a citocina inflamatória IL-17 com os estágios mais avançados de fibrose hepática.

4.8.1 Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão.

Para atingir este objetivo foi realizada análise dos resultados dos exames clínicos e das ultrassonografias e formados grupos de pacientes para avaliação

imunológica de acordo com as formas clínicas apresentadas utilizando a classificação de Pessoa & Barros, 1953 (Castro, 2009), os mesmos descritos acima (**Secção 4.3.1**). Assim, foram definidos 3 grupos de acordo com as formas clínicas: 1) Intestinal (I); 2) Hepatointestinal (HI); e 3) Hepatoesplênica. Além disso, foram comparados os grupos formados de acordo com os exames ultrassonográficos definidos pelo método de Niamey, conforme também descrito acima (**Secção 4.5**). Os grupos definidos para efeito de comparação nas análises foram: 1) Ausência de fibrose (Niamey 1); 2) Fibrose não excluída, possível e provável (Niamey 2 a 4); 3) Fibrose periportal (Niamey 5); e 4) Fibrose periportal avançada sem ou com hipertensão portal (Niamey 6 e 7).

Como na área de estudo só foram identificados 9 casos de pacientes hepatoesplênicos, o que já era esperado de acordo com a literatura, que relata que em áreas endêmicas a frequência da forma hepatoesplênica é de 2-7% , foram selecionados pacientes de outras cidades endêmicas, portadores da forma hepatoesplênica clássica e de confirmada etiologia esquistossomótica, que foram recrutados 19 pacientes no ambulatório de gastrohepatologia do Hospital Universitário.

Os **critérios de inclusão** utilizados foram: idade entre 2 e 75 anos, ambos os sexos, ter avaliação clínica, parasitológica e ultrassonográfica completas. Os foram: sorologia positiva para os vírus da hepatite B, C, HIV ou HTLV-1, gestantes, diabéticos, etilismo crônico, insuficiência cardíaca ou portadores de outras doenças hepáticas que promovam fibrose hepática e hipertensão portal.

4.8.2 Avaliação imunológica

Será realizada como descrita acima nas **secções 4.7.3 e 4.7.4**.

4.8.3 Análises estatísticas

As diferenças entre subgrupos de pacientes com diferentes formas clínicas e os graus diferentes de fibrose hepática descritos acima foram comparados em relação a outras variáveis categóricas como os dados demográficos (Idade, gênero), graus de contato com a água e graus de infecção pelo cálculo das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança 95% (IC 95%). Além disso, as variáveis numéricas, como o número de ovos/g de fezes e as concentrações das citocinas nos sobrenadantes de PBMC, foram comparadas entre estes grupos pelo teste não paramétrico (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunns). Estas análises foram realizadas utilizando os programas EpiInfo versão 3.5.1 e GraphPad PRISM, versão 4.0. Um valor de $\alpha \leq 5\%$ ($p \leq 0.05$) foi considerado para significância estatística.

5. Resultados

5.1 Descrição dos aspectos demográficos e epidemiológicos da população estudada

Os dados obtidos do inquérito clínico-epidemiológico e coproparasitológico de 500 indivíduos residentes em Ilha das Flores, Sergipe, são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados dos inquéritos clínico-epidemiológico e coproparasitológico de indivíduos da área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe

Variáveis	População Estudada
Idade (n=487)	
Variação	1 - 77
Média ±DP	24,6±17,4
Mediana	19
Gênero Masculino	250/482 (51,8%)
Ter qualquer nível de contato com água.	438/464 (94,4%)
Grau III de contato com água	269/464 (58%)
Beber água não tratada	147/489 (30%)
Renda Familiar < 1salário mínimo	261/480 (54,6%)
Lavrador	88/482 (18,2%)
Pescador	40/482 (8,3%)
Escolaridade < ensino fundamental	363/481 (75,4%)

Dos 500 indivíduos 120 (24%) apresentaram parasitológico positivo para *S. mansoni*, BCa (Bootstrap) 95% [20.4 a 27.6]. A idade variou de 1 a 77 anos, média $24,6 \pm 17,4$; 250/482 (51,8% são do gênero masculino; o grau de escolaridade avaliado foi 14% analfabetos, apenas 1,2% grau superior completo e incompleto, sendo 75,4% escolaridade < nível fundamental.

Comparação entre os indivíduos não infectados (n = 380) com os 120 indivíduos positivos em relação aos dados demográficos, socioeconômicos, culturais e educacionais são mostrados na **Tabela 2**. No grupo dos 120 infectados, 115 responderam ao inquérito clínico epidemiológico, sendo observado que a idade variou de 2 a 73 anos, com média de 26 ± 14 anos, 75/115 (65%) dos indivíduos infectados eram do gênero masculino. Quanto às atividades laborais, cerca de 45% da população entrevistada ou era lavrador ou pescador, respectivamente. A maior parte da população tem rendimento inferior a 1 (um) salário mínimo. 16% dos pacientes positivos para esquistossomose apresentavam em suas residências esgoto a céu aberto. Foram observadas associações entre infecção pelo *S. mansoni* e gênero masculino (RP 2,1; IC 95% [1,3 - 3,2], P=0,001) e ter renda < 1 salário mínimo (RP 2,2; IC 95% [1,0 - 2,4]; p= 0,0005). Foram observadas também associações entre infecção por *S. mansoni* e atividades ou hábitos associados ao contato com fontes hídricas superficiais contaminadas como ser agricultor (RP 2,4; IC 95% [1,4 - 3,9]; p= 0,001), ou pescador (RP 2,7; IC 95% [1,4 - 5,2]; p=0,006), beber água não tratada (RP 1,6; IC 95% [1,0 - 2,4]; p=0,05), ter qualquer nível de contato com água (RP 2,6; IC 95% [0,78 - 8,9] ;p=0,16), sendo esta associação ainda, não significativa, mais se torna muito importante quando comparado o grau III de contato com a água (> 6 horas/semana) com o grau 0 (nenhum contato com água natural) (RP 3.6, 95% CI [1.05 - 12.32]; p = 0.04).

Tabela 2. Dados comparativos dos inquéritos clínico-epidemiológico e coproparasitológico de indivíduos negativos e positivos para a infecção por *S. mansoni* da área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe

Variáveis	Positivos para Schistosomose	Negativos para Schistosomose	Estatísticas
Número de Pessoas	120	380	24% (prevalência)
Idade			
Variação	2 - 73	1 - 77	
Média±DP	26±14	24±18	
Mediana	23	19	p = 0,054*
≥ 15 anos	90/118 (76%)	224/370 (60%)	RP 1,9; IC 95% [1,2 - 3,1], p=0,009**
Gênero Masculino	75/115 (65%)	175/367 (48%)	RP 2,1; IC 95% [1,3 - 3,2], P=0,001
Qualquer nível de contato com água.	112/115 (97%)	326/349 (93%)	RP 2,6; IC 95% [0,78 - 8,9] ;p=0,16
Grau III de contato com água	86/115 (75%)	183/349 (52%)	RP 3,6; IC 95% [1,1 - 12]; p=0,042
Renda Familiar < 1salário mínimo	80/115 (69%)	181/355 (51%)	RP 2,2; IC 95% [1,4 - 3,4]; p= 0,0005
Beber água não tratada	44/117 (38%)	103/372 (28%)	RP 1,6; IC 95% [1,0 - 2,4]; p=0,05
Lavrador	33/113(29%)	55/369(15%)	RP 2,4; IC 95% [1,4 - 3,9]; p= 0,001
Pescador	17/113(15%)	23/369 (6,2%)	RP 2,7; IC 95% [1,4 - 5,2]; p=0,006
Escolaridade < Ensino Fundamental	85/111(77%)	277/361 (77%)	RP 1,0; IC 95% [0,63 - 1,7]; P=1,00

*(Mann-Whitney); **(Teste Exato de Fischer)

Comparação das intensidades de infecção pelo *S. mansoni* (número de ovos/g de fezes) pelo Kato-Kaz entre indivíduos classificados de acordo com o grau de contato com a água mostra maior intensidade de infecção nos indivíduos com grau III de contato com a água (**gráfico 1**)

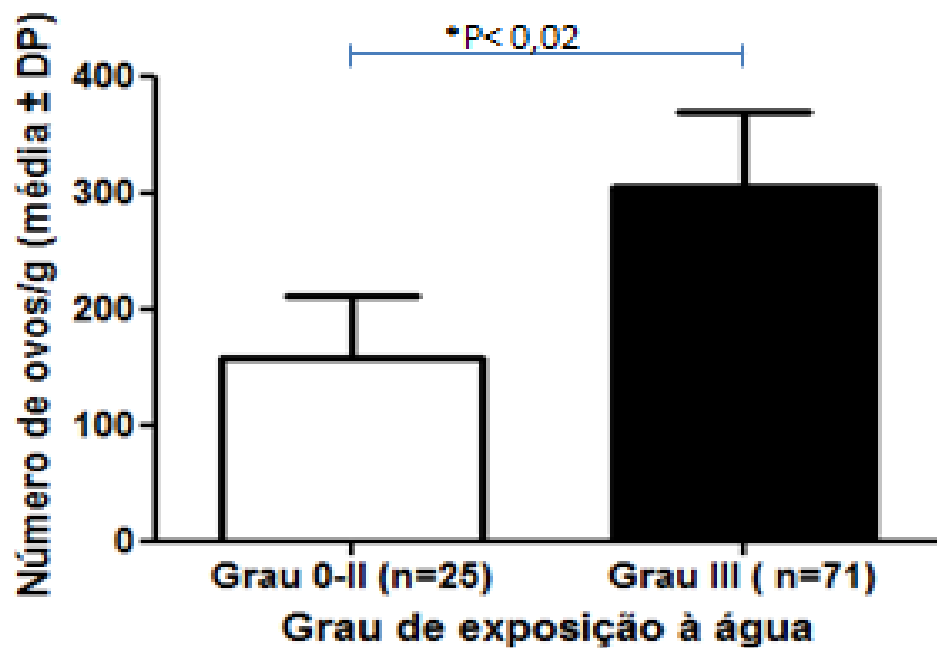


Gráfico 1. Comparação das intensidades da infecção por *S. mansoni* entre indivíduos classificados de acordo com o grau de contato com a água. Os dados representam as medianas e interquartis (*Mann-Whitney).

5.2 Descrição dos aspectos demográficos e epidemiológicos dos indivíduos com diferentes forma clínicas

Dos 120 indivíduos positivos para *S. mansoni*, 80 (66,7%) não apresentaram ao exame clínico fígado e baço palpáveis, sendo desta forma, denominados de portadores da forma intestinal (I) da doença, 31 (25,8%) foram classificados como portadores da forma hepatointestinal (HI) e 9 (7,5%) como hepatoesplênicos (HE), mas para as análises estatísticas estes dois últimos serão avaliados em um único grupo. Comparação entre os dados demográficos, epidemiológicos e coproparasitológicos dos indivíduos classificados de acordo com as formas clínicas da esquistossomose é mostrada na tabela 3.

Tabela 3. Dados demográficos, epidemiológicos e coproparasitológicos dos indivíduos classificados de acordo com as formas clínicas da esquistossomose, da área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe

Variáveis	I ^a	HI + HE ^b	Estatística
Prevalência	80 (66,7%)	40 (33,3%)	
Idade			
Variação	2 - 73	5 - 58	
Média±DP	25±15	28±13	
Mediana	22	29	P = 0,09*
≥ 15 anos	58/78 (74%)	33/40 (82%)	RP 1,6; IC95% [0,62 -4,3]; p=0,36**
Gênero Masculino	53/75 (71%)	20/38 (53%)	RP 0,46; IC95% [0,21- 1,0]; p=0,06**
Ter qualquer nível de contato com água.	74/75	38/40	RP 0,26; IC 95% [0,023-2,9]; P=0,28**
Grau III de contato com água	54/75 (72%)	32/40 (80%)	RP 1,6; IC 95% [0,62 – 3,9]; P=0,38**
Carga Parasitária (ovos/g fezes)			
Variação	23 - 3600	23 - 1500	
Média±DP	240±520	270±380	
Mediana	92	92	P=0,74*
Renda Familiar < 1salário mínimo	48/76 (63%)	32/39 (82%)	RP 2,7; IC 95% [1,0-6,8]; p= 0,05**
Beber água não tratada	23/77(30%)	21/40 (52%)	RP 2,6%; IC 95% [1,2-5,7]; p= 0,03**
Lavrador	19/74 (26%)	14/38 (37%)	RP 1,7; IC 95% [0,73 – 3,9]; p= 0,26**
Pescador	11/74 (15%)	6/39 (15%)	RP 1,0; IC 95% [0,36 – 3,1]; p= 1,00**
Escolaridade < Ensino Fundamental	54/71(76%)	32/40 (80%)	RP 1,3; IC 95% [0,49 – 3,2]; p=0,81**
Esgotamento a Céu aberto	9/75 (12%)	7/40 (18%)	RP 1,6; IC 95% [0,53 – 4,5]; p= 0,41**
Sintomas			

Diarréia	29/75 (39%)	23/40 (58%)	RP 2,1; IC 95% [0,98 – 4,7]; p=0,08**
Muco nas Fezes	24/72 (33%)	20/40 (50%)	RP 2,0; IC 95% [0,91 – 4,4]; p=0,11**
Sangue nas Fezes	14/72 (19%)	14/40 (35%)	RP 2,2; IC 95% [0,93 – 5,3]; p=0,11**

a (Intestinal) e b (Hepatointestinal + Hepatoesplênica) *(Mann-Whitney); **(Teste exato de Fischer)

Observa-se uma maior intensidade da infecção, avaliada pelo número de ovos/g de fezes, pelo método Kato-Katz nos indivíduos com a forma HE em relação aos das formas HI e I ($p = 0,02$; Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns), **gráfico 2**.

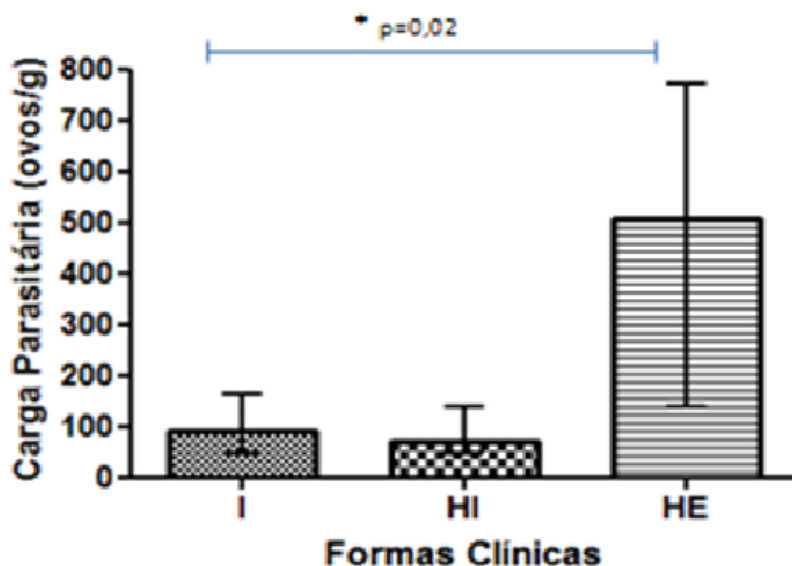


Gráfico 2. Comparação das intensidades da infecção por *S. mansoni* entre indivíduos classificados de acordo com as formas clínicas. Os dados representam as medianas e interquartis (*Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

A imagem aérea da área urbana de Ilha das Flores é mostrada na figura 1A, em destaque os povoados que compõem a cidade. A distribuição espacial dos indivíduos (classificados de acordo com as formas clínicas) na área endêmica é mostrada na figura 1B. A figura mostra a malha urbana de um dos principais povoados estudados do município de Ilha das Flores (Bolivar) com uma marcação das casas e dos indivíduos classificados de acordo com as formas clínicas da doença por exame clínico. Observa-se

que a maioria dos indivíduos apresenta a forma intestinal (quadrados verdes) e a minoria apresentam a forma hepatoesplênica (quadrados vermelhos). Observa-se que há casas com mais de 1 paciente com a forma HE e também com pacientes com a forma HI (casas marcadas com “a”), mostrando uma agregação de formas graves na mesma família.

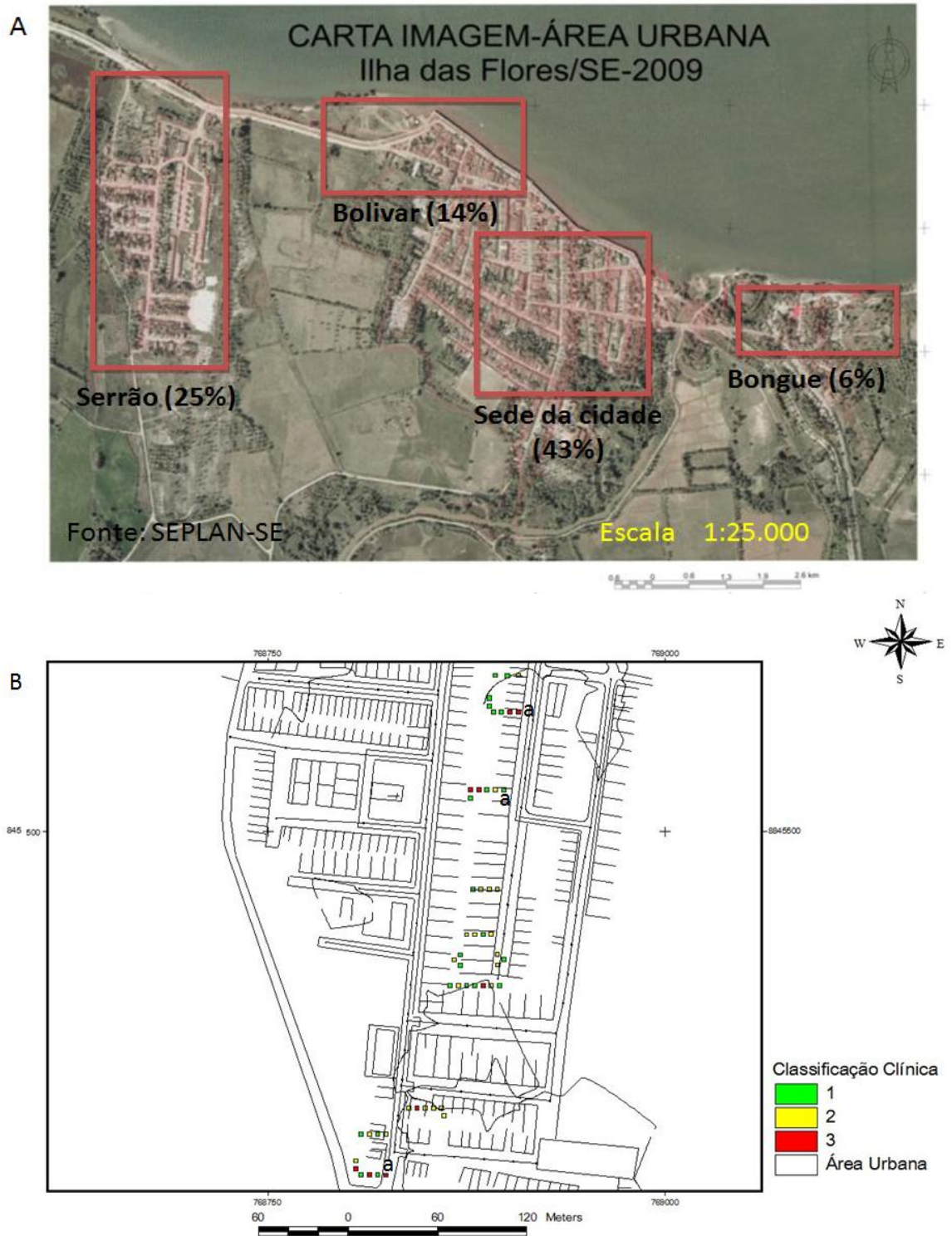


Figura 1. A Carta imagem da área urbana de Ilha das Flores (os quadros destacam as principais áreas da cidade). B. Distribuição espacial das formas clínicas no Bolivar, um dos povoados do município de Ilha das Flores, SE. Os pontos coloridos representam os pacientes portadores das formas clínicas: hepatoesplênica (vermelhos), hepatointestinal (amarelos) e intestinal (verdes). As casas que possuem agregação de pacientes HE são mostradas com “a”.

5.3 Avaliação da resposta imune celular em indivíduos classificados de acordo com a intensidade da infecção

A avaliação da resposta imune foi feita pela dosagem de IL-5, IFN- γ e IL-17 em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos indivíduos. Para avaliar o efeito da intensidade da infecção na resposta imune, foram comparadas as concentrações dessas citocinas entre indivíduos classificados de acordo com os critérios de gravidade da Organização Mundial de Saúde (OMS) em ≤ 100 , de 100 a 400 e ≥ 400 ovos/g de fezes. Foi observado que as concentrações de IL-5 nos sobrenadantes de PBMC estimuladas por SWAP aumentam progressivamente com a intensidade da infecção, $p = 0,02$, Kruskal-Wallis, com post test de Dunns mostrando diferenças entre os grupos com ≤ 100 e ≥ 400 ovos/g (Gráfico 3A). Por outro lado a secreção de IL-5 em resposta ao SEA não foram diferentes entre estes grupos (Gráfico 3B).

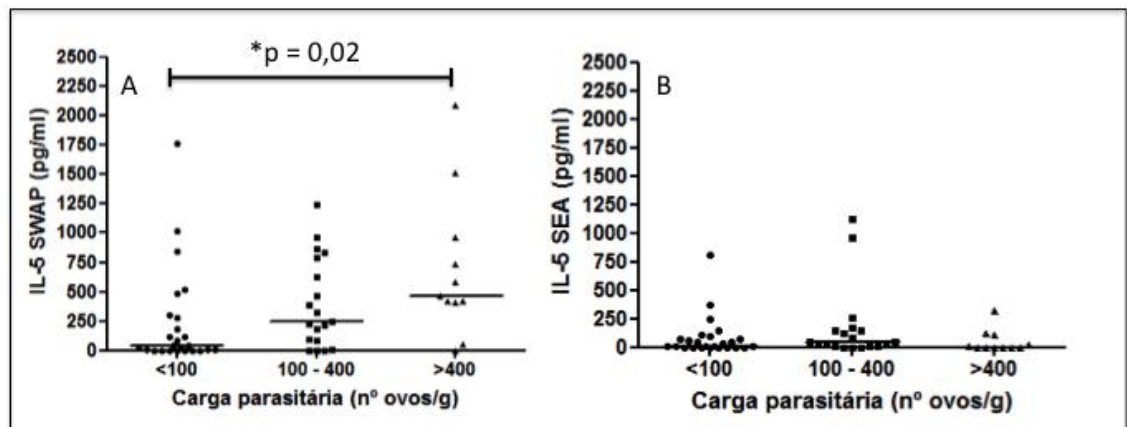


Gráfico 3. Comparações entre as concentrações de IL-5 em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas pelos antígenos SWAP (A) e SEA (B) nos indivíduos com diferentes intensidades da infecção por *S. mansoni* pelo Kato-Katz. Os dados representam os valores e as medianas são mostradas (*Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de IFN- γ (Gráfico 4) nem de IL-17 (Gráfico 5) entre os grupos analisados, embora haja uma tendência à uma redução de IFN- γ com o aumento do grau de infecção.

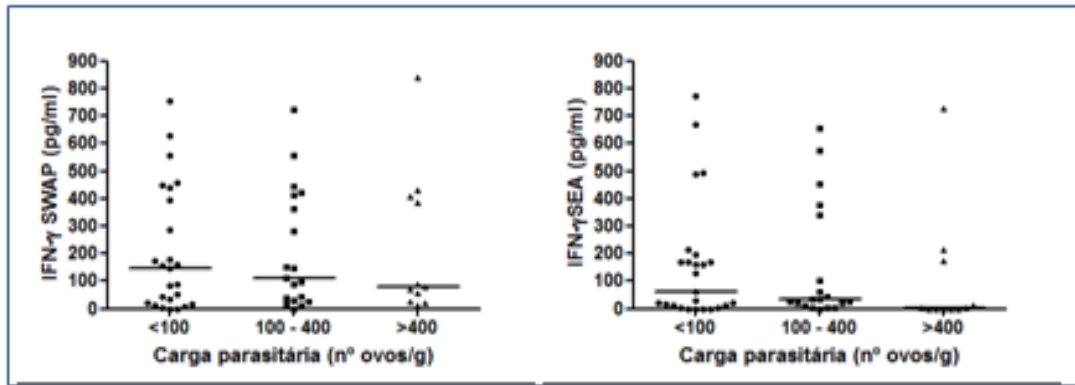


Gráfico 4. Comparações entre as concentrações de IFN- γ em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas pelos antígenos SWAP (A) e SEA (B) entre indivíduos com diferentes intensidades da infecção por *S. mansoni* pelo Kato-Katz. Os dados representam valores e as medianas são mostradas (diferenças não significantes, Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

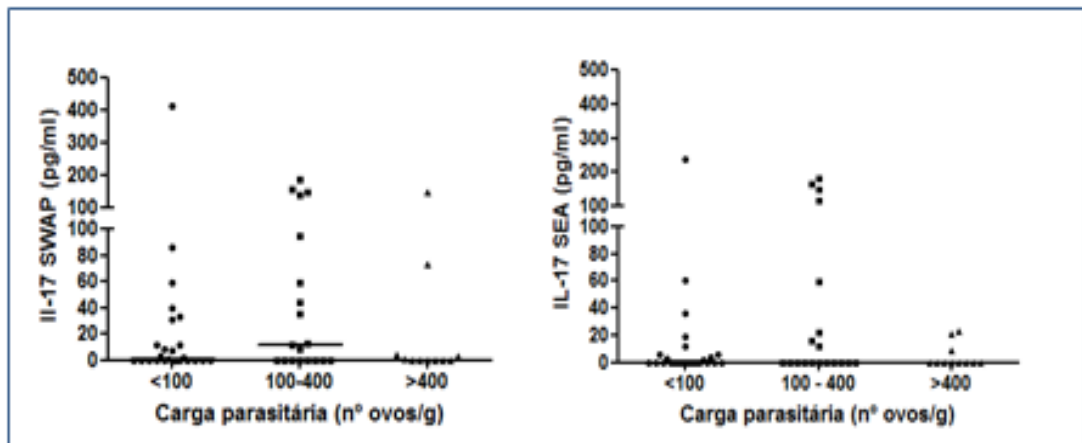


Gráfico 5. Comparações entre as concentrações de IL-17 em sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas pelos antígenos SWAP (A) e SEA (B) entre indivíduos com diferentes intensidades da infecção por *S. mansoni* pelo Kato-Katz. Os dados representam os valores e as medianas são mostradas (diferenças não significantes, Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

Foram feitas correlações entre as concentrações dessas citocinas com as cargas parasitárias (número de ovos/g de fezes) dos indivíduos pelo Kato-Katz, sendo observada uma correlação direta entre as concentrações de IL-5 em resposta a antígeno

SWAP e número de ovos/g de fezes, r Spearman = 0,41, IC 95% 0,16 – 0,61, $p = 0.002$ (**Gráfico 6**). Não foram observadas correlações entre a intensidade da infecção e as concentrações de nenhuma outra citocina avaliada (dados não mostrados).

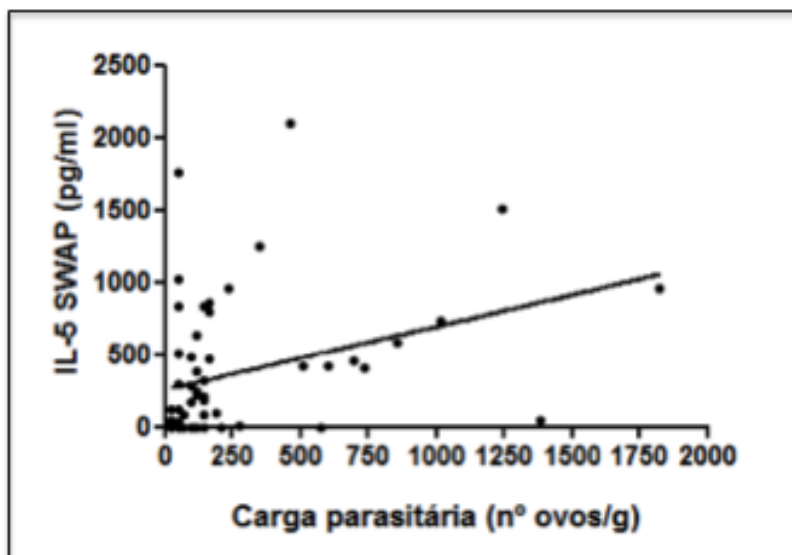


Gráfico 6. Correlação entre as concentrações de IL-5 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o número de ovos/g de fezes de indivíduos infectados por *S. mansoni*. r Spearman = 0,41, IC 95% 0,16 – 0,61, $p = 0.002$.

5.4 Avaliação da resposta imune celular em indivíduos classificados de acordo as formas clínicas da doença determinadas por exame físico e ultrassonográfico

Foram comparadas as concentrações das citocinas IL-5, IFN- γ e IL-17 entre indivíduos classificados de acordo com as formas clínicas pelo exame físico do fígado e baço, que refletem a gravidade da doença, formas intestinal (I), hepatointestinal (HI) e hepatoesplênica (HE). Os indivíduos hepatoesplênicos foram subdivididos em HE da área endêmica e HE do Hospital Universitário (HE (HU))

As características clínicas e demográficas dos indivíduos hepatoesplênicos recrutados no HU são comparadas com as dos pacientes hepatoesplênicos da área endêmica na **Tabela 4**. Observa-se claramente que os pacientes hepatoesplênicos do HU apresentam maior gravidade da doença, principalmente pelas medidas do tamanho do baço e presença de hipertensão portal.

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos hepatoesplênicos do Hospital Universitário (HE (HU)) e da área endêmica de Ilha das Flores (HE), Sergipe.

Variáveis	HE	HE (HU)	Estatística
Número	9	19	
Idade (anos)			
Variação	16-45	23-76	
Média± D.P.	31±10	53±16	
Mediana	30	57	p = 0,003
Gênero Masculino	6 (67%)	12 (63%)	
Lavrador	4 (44%)	10 (53%)	
Exame clínico			
Tamanho do fígado	5,8±1,1	4,3±2,6	p = 0,05
Tamanho do baço	1,3±0,5	6,1±2,9	p = 0,0005
Ultrassonografia			
Tamanho do fígado	87±15	79±17	p = 0,29
Tamanho do baço	120±23	180±37	p = 0,001
Espaço periportal 1 (mm)	2,1±0,4	5,2±3,3	p = 0,0002
Diâmetro da veia porta (mm)	10±1,6	13±2,2	p = 0,004
Ascite	0	2 (10%)	
Varizes de esôfago na endoscopia digestiva	Não realizado	20 (100%)	

As concentrações de IL-17 são significativamente mais elevadas nos sobrenadantes de PBMC mesmo sem estímulo ou estimuladas por SWAP e SEA dos

pacientes hepatoesplênicos mais graves atendidos no HU “HE (HU)”, **Gráfico 7**. Não foram encontradas diferenças entre estes grupos de pacientes nas concentrações de IL-5 ou de IFN- γ em resposta a SWAP ou SEA (dados não mostrados).

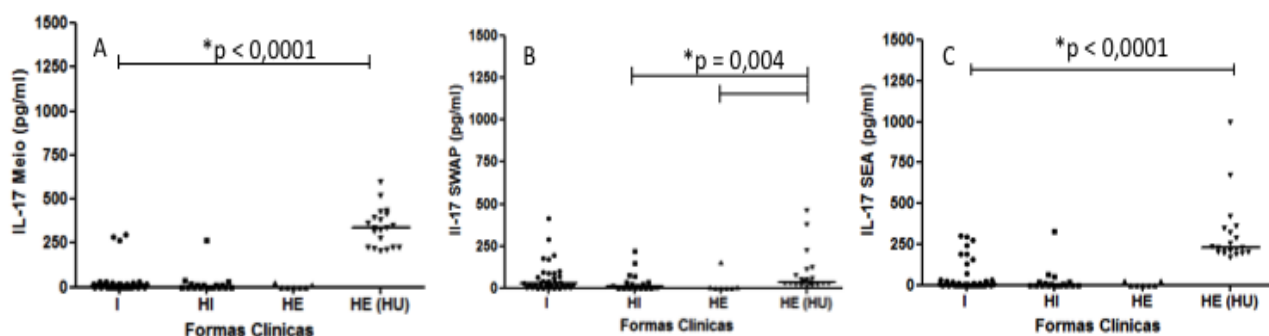


Gráfico 7. Comparações entre as concentrações de IL-17 em sobrenadantes de culturas de PBMC sem estímulo (A) ou estimuladas pelos antígenos SWAP (B) e SEA (C) entre indivíduos com diferentes formas clínicas da doença, intestinal (I)(n=38), hepatointestinal (HI)(n=18), hepatoesplênica (HE)(n=7) e hepatoesplênicos do HU “HE(HU)” (n=20). Nas comparações das concentrações de citocinas nas culturas não estimuladas ou estimuladas com SEA, foram encontradas diferenças entre todos os grupos e o grupo HE (HU). *Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

Classificando os pacientes da área endêmica de Ilha das Flores (n = 78) pelo método ultrassonográfico, segundo os critérios de Niamey, apenas 1 paciente apresentou fibrose avançada, 2 pacientes apresentaram indícios de fibrose. Todos os 19 pacientes HE do Hospital Universitário, mostrados no gráfico acima como “HE(HU)” tinham fibrose periportal avançada e 18 destes apresentavam sinais hipertensão portal.

Foram comparadas as concentrações de citocinas nestes grupos de pacientes (denominados no gráfico como “Sem fibrose”, “Provável” e “Fibrose avançada”). As concentrações de IL-17 são significativamente mais elevadas nos sobrenadantes de PBMC mesmo sem estímulo ou estimuladas por SWAP e SEA nos pacientes com fibrose avançada, os quais correspondem aos pacientes mais graves “HE (HU)”, **Gráfico 8**. Não foram encontradas diferenças entre estes grupos de pacientes nas

concentrações de IL-5 ou de IFN- γ em resposta a SWAP ou SEA (dados não mostrados).

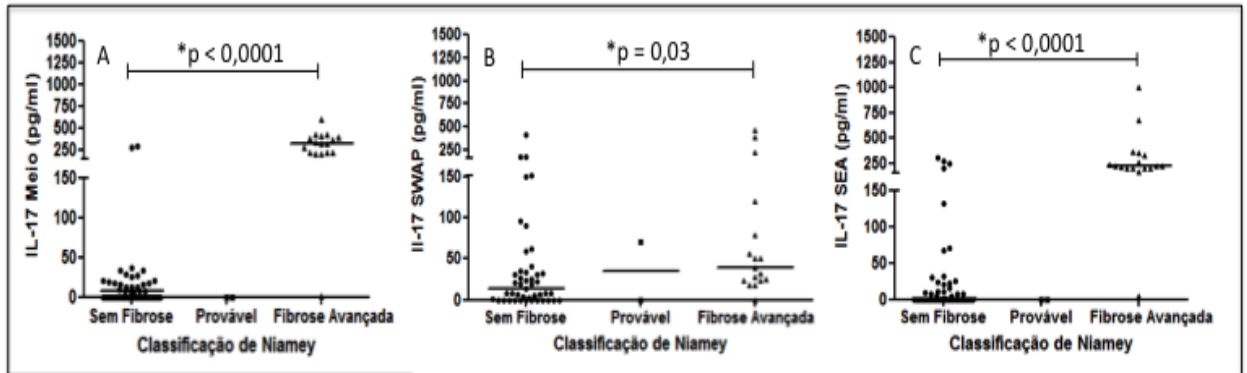


Gráfico 8. Comparações entre as concentrações de IL-17 em sobrenadantes de culturas de PBMC sem estímulo (A) ou estimuladas pelos antígenos SWAP (B) e SEA (C) entre indivíduos com diferentes graus de fibrose pelos critérios de Niamey, Sem fibrose(n=45), Provável(n=2) e Fibrose avançada(n=17). Os dados representam os valores dos pacientes e a mediana é mostrada. *Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

6. Discussão

A forma crônica da esquistossomose mansônica é mais prevalente e mais associada à morbidade em áreas endêmicas. Ilha das Flores, cidade escolhida para este estudo, apresenta, segundo o Programa de Controle da Esquistossomose do estado de Sergipe (PCE) a maior frequência para a doença (46%) no estado. Em nosso estudo, onde foram avaliados 500 indivíduos de forma aleatória, identificamos uma prevalência de 24%, destes 40 apresentaram as formas mais graves da doença, a hepatoesplênica e a hepatointestinal. A criação de um programa específico de controle da esquistossomose foi um grande avanço e resultou em uma redução de 43% nas hospitalizações e 56% da mortalidade devido à esquistossomose no período de 1979 a 1997. No entanto, os dados deste trabalho mostra que apesar da existência ainda do PCE para o controle da doença, ainda são elevados os números de infecção e reinfecção da doença em vários estados do Brasil e no estado de Sergipe, devido às condições socioambientais e econômicas (Rollemberg *et al*, 2011).

A subnotificação da doença e a coleta de dados não representativos da população podem levar a dados incorretos de prevalência tanto para valores mais baixos como mais elevados e Segundo Katz e Peixoto (2000), a ausência de dados precisos indica a necessidade de adequado levantamento nacional da prevalência da esquistossomose que continua a ser importante endemia parasitária, justificando esforços maiores para o seu controle no Brasil. Para a estimativa segura da prevalência da esquistossomose, necessita-se de levantamentos parasitológicos feitos com amostragem adequada, em nível nacional, levando em consideração que a prevalência da parasitose não apresenta distribuição regular e sim focal (Katz e Peixoto, 2000). Este fato explica a diferença

encontrada na prevalência da doença estimada pelo PCE e pelo presente estudo.

Foi demonstrado em estudo anterior que a “situação de higiene”, índice utilizado pela Superintendência de recursos hídricos e medido pelo percentual de cobertura do esgotamento sanitário, é menor nos municípios com prevalências de infecção por *S. mansoni* acima de 15%, ou seja, onde há menor rede de esgotos, a prevalência da esquistossomose é menor (Rollemberg *et al*, 2011). Ilha das Flores contava durante a realização das coletas deste estudo com apenas 3,3% de cobertura pela rede de esgotos, sendo que 16% dos pacientes positivos para esquistossomose apresentavam em suas residências esgoto a céu aberto. No ano de 2010, devido ao projeto de revitalização do São Francisco está sendo implantada na cidade uma rede de esgotos, que abrange todos os povoados do município, o que poderá proporcionar uma redução das reinfecções. Contudo, outros determinantes, chamados intermediários, como habitação e saneamento (abastecimento de água e tratamento dos esgotos), poder aquisitivo e educação, que envolve um melhor esclarecimento sobre higiene e saúde, são também importantes para manter doenças como a esquistossomose. No presente estudo, a baixa renda familiar (<1 salário mínimo), beber água não tratada estão associadas à infecção por *S. mansoni*. Outros estudos demonstraram que a educação leva as pessoas a adquirir conhecimento para a prevenção e redução dos parasitas intestinais (Ferreira, 2000).

O gênero masculino, que representou a maioria da amostra estudada (51,8%) apresentou também maior associação com a doença, muito provavelmente atribuído às atividades laborais nessa área específica onde a economia básica gira em torno da pesca e da lavoura, com predomínio de rizicultura. Os sistemas primitivos de irrigação feitos de canais e comportas são associados à manutenção de focos de esquistossomose. Neste trabalho, ser lavrador ou pescador, que são atividades em sua maioria realizadas em contato com águas superficiais também apresentou maior associação com a infecção.

Assim, o controle da transmissão vai além da capacidade dos profissionais de saúde e do tratamento em massa e deve ser feito com ações governamentais que combinem instalação de água e esgoto nas casas, mudanças no meio ambiente, educação sanitária, combate aos caramujos, além do diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas e desenvolvimento de vacinas (Katz e Peixoto, 2000).

A realização destas medidas combinadas poderia levar a um controle mesmo parcial da prevalência e da intensidade da infecção, o que poderia prevenir o aparecimento de formas mais graves da doença. A formação de granulomas ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni*, impactados no fígado de indivíduos infectados, é o mecanismo central de patogênese da lesão hepática na esquistossomose, sendo a resposta imune a principal mediadora dessa reação. A intensidade da infecção e repetidas reinfecções no decorrer da vida são importantes determinantes do aparecimento de formas graves da esquistossomose, pois aumentam o número de ovos desviados na circulação pelas veias mesentéricas e impactados no sistema porta hepático.

Estudos em modelos experimentais têm demonstrado que as citocinas são fatores importantes na formação e na modulação da resposta imune ao ovo de *S. mansoni*. A maioria dos estudos em camundongos mostram claramente o papel de citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-13 na determinação da lesão granulomatosa e fibrose hepática na esquistossomose, sendo a IL-5 importante para a eosinofilia presente nestes granulomas. Porém, estes camundongos não fazem a clássica fibrose de Symmers e hipertensão portal da esquistossomose presente na espécie humana. Posteriormente, em outro modelo de camundongo que apresenta fibrose mais semelhante à que ocorre no homem, foi evidenciado que citocinas como o TNF- α e, mais recentemente, a IL-17 tem um papel importante neste processo de fibrose.

Na espécie humana, foi observado que a reação granulomatosa difere em pacientes com diferentes formas clínicas da doença, bem como com diferentes graus de fibrose, e que há um decréscimo característico da resposta imune aos antígenos derivados do ovo na forma crônica mais grave da doença.

No entanto, a interpretação dos resultados destes estudos é dificultada pelas diferenças nos desenhos de estudo e forma de confirmação da fibrose por métodos complementares como a ultrassonografia. Alguns estudos anteriores que avaliaram a resposta imune e associaram à gravidade da doença comparam as respostas imunes de indivíduos com a forma grave hepatoesplênica com indivíduos não hepatoesplênicos (Colley, 1983; Mwatha,1998). Nestes estudos, contudo, não foram excluídas a associação de co-infecções e nem comprovada ser a hepatoesplenomegalia exclusivamente devido à esquistossomose.

A forma hepatoesplênica grave da esquistossomose desenvolve-se no decorrer de 5 a 15 anos, após reinfecções sucessivas em áreas endêmicas. Portanto, é importante avaliar a resposta imune presente nas fases evolutivas dessa lesão. O advento da ultrassonografia para classificação da fibrose hepática na esquistossomose tornou possível a detecção mais precoce da lesão hepática. É possível, que os mecanismos imunológicos envolvidos nos eventos iniciais e mais tardios e graves da fibrose hepática esquistossomose sejam distintos.

No passado, a esquistossomose hepatoesplênica era diagnosticada como estágios diferentes pelos tamanhos relativos de fígado e baço, com estágios mais graves, ocorrendo em pacientes com grandes baços e retração do fígado. Mas não havia possibilidade de fornecer um diagnóstico indicador da fibrose periportal de Symmers nos estágios menos avançados da doença. Assim, diante de outras doenças que causam esplenomegalia, como a malária e enterobactérias, o exame clínico muitas vezes não era

capaz de detectar se a esplenomegalia é devido à esquistossomose. A ultrassonografia trouxe mais subsídios para a detecção precoce da lesão hepática por *S. mansoni*, pois se baseia na medida do espaço periportal. Além disso, é capaz de avaliar diversos outros parâmetros de hipertensão portal como a medida dos calibres das veias porta e esplênica e classificar o grau de lesão em estágios mais precoces quando o exame físico ainda não detecta nenhuma alteração. O critério de Niamey, ainda avalia o padrão do parênquima hepático, que pode ser compatível com os efeitos da infecção por esquistossomose, ou que indiquem patologias diferentes da fibrose portal, como por exemplo a cirrose, e analisa características que indiquem a presença de hipertensão portal.

Homeida *et al.* demonstraram a sensibilidade da ultrassonografia para classificar o grau de lesão hepática na esquistossomose. Este método também foi importante para detectar evolução das lesões hepáticas após o tratamento (Jesus, 2000; Homeida, 1998). A comparação do método ultrassonográfico a outros métodos para diagnóstico como, parâmetros hemodinâmicos e biópsia do fígado mostra que a ultrassonografia é um método bastante sensível, específico e mais indicado por não ser um método invasivo para diagnóstico e estudos epidemiológicos.

A classificação ultrassonográfica da fibrose hepática na esquistossomose permite avaliar fatores associados à evolução da doença, a exemplo das alterações imunológicas e enzimas relacionadas ao metabolismo do colágeno. Assim permitirá avaliar melhor fatores envolvidos na evolução, bem como na involução das lesões, o que poderá trazer subsídios para o tratamento baseado em modulação desses fatores.

No presente estudo, foram avaliadas as respostas imunes de indivíduos portadores de esquistossomose mansônica classificados por exame clínico e também classificados de acordo com o método de Niamey. Esses indivíduos foram submetidos a exames parasitológicos, clínicos e ultrassonográficos, visando detectar estágios

diferentes das alterações patológicas do fígado e classificá-los em diferentes graus de fibrose. No entanto, o método ultrassonográfico não detectou estágios iniciais de fibrose, diferente de um estudo prévio realizado em outra área endêmica (Caatinga do Moura) que detectou estágios iniciais de fibrose na maioria dos pacientes de área endêmica na Bahia (Jesus, 2002; Jesus, 2004). No estudo atual os indivíduos da área endêmica de Ilha das Flores em sua grande maioria não apresentam fibrose detectada pela ultrassonografia, apesar de quase a metade deles, ser classificada ao exame físico como portadores de formas HI e HE. É possível que aspectos genéticos desta população e o fato desta área endêmica ser mais nova possam explicar estas diferenças. No entanto, foram encontrados indivíduos nesta área endêmica com grande intensidade de infecção e maior número de ovos/g de fezes nos indivíduos com as formas mais graves da doença pelo exame clínico, sugerindo que este reflita corretamente a gravidade da doença.

Tem sido descrito que a carga parasitária elevada é um fator predisponente para o desenvolvimento das formas graves (Sleigh, 1985). Esse fator representa, contudo, um dos fatores que irá levar a deposição de ovos no fígado, estímulo inicial para indução das lesões no fígado.

No entanto, outros fatores como: o background genético do indivíduo, bem como a resposta imune aos antígenos do parasito podem ser importantes tanto para determinar um maior desvio de ovos do parasito para a circulação porta, como também pode mediar uma lesão inflamatória mais intensa, a qual determina a formação de granuloma e posteriormente a fibrose portal característico da doença.

Analisamos as respostas imunes em indivíduos classificados pela gravidade da intensidade da infecção e observamos uma crescente produção de IL-5 em resposta ao SWAP nos pacientes com ≤ 100 , entre 100 e 400 e ≥ 400 ovos/g de fezes, havendo uma

correlação direta entre intensidade da infecção e estas concentrações de IL-5. Estes dados sugerem que a intensidade da infecção gera uma resposta tipo Th2, como já foi bem demonstrada em outros estudos (Jesus, 2001). Quanto à IL-17 e IFN- γ , não foram observadas diferenças entre os grupos, apesar de haver uma tendência à redução do IFN- γ com o aumento do grau de infecção.

Em estudo anterior foi demonstrada um aumento de citocinas Th2 (IL-5, e IL-13) e também TGF- β com a evolução do grau de fibrose pela US, sugerindo a participação destas citocinas nos eventos iniciais da fibrose hepática. No estudo atual apenas 3 grupos foram definidos pela US (Ausência de fibrose, fibrose provável e fibrose avançada), havendo uma grande dispersão dos valores das citocinas no grupo sem fibrose. Isto pode sugerir a presença de diferentes estágios de fibrose, não detectada pela falta de sensibilidade do exame US. Esta variação dos resultados US nos diferentes estudos quando realizados por examinadores distintos, sugere uma dificuldade do método, que depende muito da sensibilidade do aparelho e treinamento do examinador. Assim, outros métodos mais precisos e mais reprodutíveis precisam ser desenvolvidos.

Como na área endêmica não havia pacientes hepatoesplênicos mais graves nem pelo exame clínico nem pelo US, foi incluído no estudo um grupo de pacientes ambulatoriais com a forma hepatoesplênica mais grave. A avaliação da resposta imune foi realizada nos diferentes grupos, no intuito de detectar marcadores imunológicos relacionados com o desenvolvimento da lesão responsável pela gravidade da doença.

Na esquistossomose murina, a patologia tem sido correlacionada com a resposta do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), porém citocinas como o TNF- α têm sido demonstradas serem importantes na formação do granuloma. A presença de eosinófilos no granuloma ativo e a evidência de uma resposta tipo 2 muito mais intensa em indivíduos com a

forma crônica de áreas endêmicas de esquistossomose, sugerem que esta resposta esteja participando do processo de formação da reação granulomatosa (Araújo, 1996).

Estudo recente, do tipo caso-controle, comparando a resposta imune de pacientes hepatoesplênicos e não hepatoesplênicos, pareados por idade e grau de infecção, evidenciou níveis mais elevados de TNF- α e IFN- γ e mais baixos de IL-5 em sobrenadantes de PBMC estimuladas com antígeno de ovo de *S. mansoni* em indivíduos hepatoesplênicos quando comparados a não hepatoesplênicos. Estes dados sugerem que, ao contrário do demonstrado em camundongos, no homem a resposta Th1 foi mais evidenciada em indivíduos com a forma hepatoesplênica da doença. Nesse estudo, há dois pontos principais, que podem levar a um viés de interpretação dos resultados, um deles é que os indivíduos hepatoesplênicos estudados são provenientes de uma área onde existe co-infecção com malária. Tendo estes sido classificados apenas por exame clínico, o achado de hepatoesplenomegalia pode dever-se também à malária, apesar destes indivíduos estarem com parasitemia negativa nos últimos 3 meses da avaliação realizada. Além disso, mesmo sendo estes indivíduos hepatoesplênicos pela esquistossomose, a presença de co-infecção por malária poderia justificar os altos níveis de TNF- α e IFN- γ encontrados nesses pacientes, pois é bem conhecido a indução dessas citocinas na malária e o papel imunopatogênico do TNF- α na malária. Adicionalmente, sabendo-se que são necessários cerca de 5 a 15 anos a partir do início da infecção para que a forma hepatoesplênica se manifeste, o achado de níveis mais elevados das citocinas Th1 em indivíduos hepatoesplênicos encontrados no estudo da África pode refletir algum aspecto da resposta que induziu a lesão, porém pode representar uma tentativa de modular esta lesão (Mwatha, 1998).

Em camundongos, Stadecker, *et al* demonstrou que a IL-17 desempenha um papel crítico na imunopatologia da esquistossomose e que as células Th17 são

estimuladas pela IL-23 (Stadecker, 2005). Outro estudo realizado com camundongos, pelo mesmo grupo, demonstrou que o subconjunto Th17 é um marcador mais provável de doença grave (Stadecker, 2009).

No presente estudo foi observado, uma predominância da produção de IL-17 (TH-17) nos indivíduos com a forma hepatoesplênica mais grave que foram recrutados de outras cidades sergipanas, mesmo em culturas sem estímulo, ou estimuladas por antígenos de *S. mansoni*, não havendo diferenças estatísticas nas concentrações de IL-5 ou de IFN- γ em resposta a SWAP ou SEA. Estes dados são pioneiros em mostrar a participação da IL-17 na gravidade da doença. Curiosamente, esta citocina está aumentada mesmo nas culturas sem estímulo, o que nos sugere que estes pacientes já estejam produzindo altas concentrações de IL-17 *in vivo*. Isto pode ocorrer ou por estímulo dos antígenos do parasito, a exemplo do que foi observado na esquistossomose aguda (Jesus, 2002). Alternativamente, fatores genéticos, como a presença de polimorfismos em genes reguladores da produção de IL-17, podem explicar esta resposta e predispor a fibrose mais grave nestes indivíduos. Estudos funcionais analisando a resposta imune em indivíduos com polimorfismos genéticos em genes de IL-6 e CCL2/MCP-1 mostra dados semelhantes em culturas sem estímulo (Castellucci, 2006 e Ramasawmy, 2011).

7. Conclusões

1. Uma alta frequência de cargas parasitárias elevadas e de formas graves da esquistossomose (HI e HE) foram observadas na área endêmica de Ilha das Flores, Sergipe.
2. A positividade à infecção foi associada com fatores socioeconômicos e ambientais.
3. O grau de infecção, medido pela carga parasitária, é influenciado pelo grau de contato com fontes hídricas superficiais.
4. A intensidade da infecção tem influência nas formas clínicas da doença.
5. Na avaliação da resposta imune foi observado que a intensidade da infecção se correlaciona diretamente com a resposta Th2 a antígenos do verme adulto.
6. A avaliação da resposta imune demonstrou também dados pioneiros de que a gravidade da doença está associada à produção aumentada de IL-17.

8. Considerações éticas

Este trabalho faz parte de um projeto mais abrangente. O protocolo da pesquisa-objeto deste estudo foi submetido ao **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU)**, obtendo sua aprovação por seguir as instruções da resolução 196/96. Protocolo **SISNEP 0022.0.107.000-08**.

Todos os indivíduos da amostra selecionada receberam uma explicação verbal sobre o projeto e os procedimentos aos quais seriam submetidos e foram convidados a participar do estudo, sendo solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (**TCLE**) por escrito pelos pacientes ou responsáveis em caso de menores de 18 anos, confirmando suas participações.

A coleta de dados foi supervisionada pela Dra Amélia de Jesus (coordenadora do projeto e orientadora) e Dr. Mário Adriano Santos (Professor do Depto de Medicina da UFS e colaborador do projeto). A coleta de material biológico seguiu as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO) e do Center for Disease Control (CDC).

O presente estudo não traz nenhum grande **risco para os sujeitos da pesquisa**, além de pequeno incômodo decorrente do preenchimento de cadastros e questionário e realização do parasitológico de fezes. Quanto à **confidencialidade** dos dados, os arquivos físicos (questionários e TCLE) e eletrônicos do projeto (Banco de dados, resultados brutos) estão guardados com segurança. O único documento que contém a identificação do paciente é o TCLE, o qual está em local separado dos outros documentos. O questionário e o banco de dados contêm apenas um código do indivíduo.

9. Referências

ABDEL-WAHAB, M.F. *et al.* Grading of Hepatic Schistosomiasis by the Use of Ultrasonography. **Am J Trop Med Hyg**, v.46, n.4, p.403-408, 1992.

ABDEL WAHAB, M.F.; ABDEL LATIF, Z.; EL KADY, N.M.; ARAFA, N.M., editores. The use of ultrasonography in diagnosis of different *schistosomal*-syndromes. **Proceedings of the Third International Workshop on Diagnostic Ultrasound Imaging** (Cairo, Egypt): Al-Ahram Press, 1978. p.458-463.

ABDEL-WAHAB, M.F. *et al.* Characteristic sonographic patterns of *schistosomal* hepatic fibrosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.40, n.1, p.72-76, 1989.

ABDEL-WAHAB, M.F. & STRICKLAND, G.T. Abdominal ultrasonography for assessing morbidity from schistosomiasis 2. Hospital studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine**, Londres, v.87, n.2, p.135-137, 1993.

AKDIS, M.; *et. al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. Switzerland: **American Academy of Allergy, Asthma & Immunology**, 2011.

ARAUJO, M. I.; BACELLAR, O.; JESUS, A.R.; CARVALHO, E. M.. The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. **Braz J Med Biol Res.** 27: 1619-25. 1994.

ARAUJO, M. I.; JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E. M.. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol.** 26: 1399-403. 1996.

AURIALT, C.; GRAS-MASSE, H.; PIERCE, R.J.; BUTTERWORTH, A.E.; WOLOWCZUK, I.; CAPRON, M.; OUMA, J.H.; BALLOUL, J.M.; KHALIFE, J.; NEYRINCK, J.L.; TARTAR, A.; KOECH, D.;CAPRON, A. . Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. **J Clin Microbiol** 28: 1918-1912.

AURIALT, C.; OUAISSI, M.A.; TORPIER, G.; EISEN, H.; CAPRON, A.. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. **Parasite Immunol** 3: 33-44. 1981.

BARBOSA, C.S. *et. al.* Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, n.3, p.725-728, 2001.

BARBOSA, F.S. Determination and control of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;90(2):155-9. Mar-Apr, 1995.

BINA J.C.; PRATA, A.. A Evolução Natural da Esquistossomose mansoni em uma Area Endêmica. Bahia: Cedre. 1990.

BINA J.C.; PRATA A.. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Bahia, 2003. 36(2): 21-216.

BINA J.C.; PRATA, A.; NETO, J.T.. Greater Resistance to Development of Severe Schistosomiasis in Brazilian Negroes. **Human Biology**, 1978.

BINA, J. C.. Influência da terapêutica Específica na Evolução da Esquistossomose Mansoni. **Rev. Patol. Trop.** 10: 221-267. 1981.

BINA, J. C.. Estudo de Variáveis que Podem Influenciar na Evolução da Esquistossomose Mansônica: Efeito da Terapêutica Específica e da Interrupção da Transmissão, Universidade Federal da Bahia. 1995.

BOOTH, M. *et al.* Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **J Immunol**, v.172, n.2, p.1295-1303, Jan. 2004.

BUTTERWORTH, A.E. *et al.* Longitudinal studies on human schistosomiasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.321, n.1207, p.495-511, 1988.

CAIRO WORKING GROUP 1992. The use of diagnostic ultra-sound in schistosomiasis – attempts at standardization of methodology. **Acta Tropica**, Basel, v.51, p.45-63, 1992.

CASTELLUCCI, L.; MENEZES, E.; OLIVEIRA, J.; MAGALHAES, A.; GUIMARAES, L.H.; LESSA, M.; RIBEIRO, S.; REALE, J.; NORONHA, E.F.; WILSON, M.E.; DUGGAL, P.; BEATY, T.H.; JERONIMO, S.; JAMIESON, S.E.; BALES, A.; BLACKWELL, J.M.; JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.. IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J. Infect. Dis.** 194, 519–527. 2006.

CASTRO, A.K.S.. **Avaliação clínica-epidemiológica da esquistossomose mansoni em Comercinho, MG (1981-2005)**. Belo Horizonte, 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais.

CIMERMAN, B.. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. 2ªed. São Paulo: Atheneu, 2005.

CHIARAMONTE, M. G.; CHEEVER, A. W.; MALLEY, J. D.; Donaldson, D. D; WYNN, T. A.. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**. 34: 273-82. 2001

COCUDE, C.; PIERROT, C.; CETRE, C. FONTAINE, J.; GODIN, C.; CAPRON, A.; KHALIFE, J.. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I. **Parasitology** 118: 389 – 396.

COLLEY, D. G., N. KATZ, R. S. ROCHA, W. ABRANTES, A. L. DA SILVA, G. GAZZINELLI. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. IX. T-lymphocyte subset analysis by monoclonal antibodies in hepatosplenic disease. **Scand J Immunol.** 17: 297-302. 1983.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.77, p.947-977, 2005.

COURA-FILHO, P. Schistosomiasis mansoni occurrence in urban territory. 1. A case study of a peripheral urban area in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cad Saude Publica** 1997; 13: 245-255.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004; 99:13-19.

COURA, J.R.; CONCEICAO, J.; SANTOS, M.L.; MENDONCA, Z.G.; CUTRIM, R.N.. Cross-sectional and evolutive studies of schistosomiasis mansoni in untreated and mass treated endemic areas in the southeast and northeast of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1992; 87 (suppl 4):175-182.

COTA, G.F. **Esquistossomose hepatoesplênica:** considerações sobre os critérios diagnósticos clínicos e ultra-sonográficos em área endêmica para o *S. mansoni* antes e quatro anos após o tratamento clínico. 2002. 144p. Dissertação (Mestrado em Medicina, Área de Concentração em Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COTA, G.F. *et al.* Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.74, n.1, p.103-107, 2006.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, E.; KARDORFF. R.. Ultrasonography in schistosomiasis in Africa. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 90: 141-5. 1995.

DAVIS A. Schistosomiasis, In: COOK, Gordan C (Ed), *Manson's Tropical Diseases:* Saunders: Londdon, 1413-56p., 1997.

DENG, J.; GOLD, D.; LO VERDE, P.T.;FISHELSON, Z.. Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. **Infect Immun** 71: 6402 – 6410. 2003.

DESSEIN, A.J. *et al.* Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG

reactivity to a 37-kda larval surface antigen. **J. Immunol**, n. 140,p.2727-2736, 1988.

DESSEIN, A.J. *et al.*. Environmental, Genetic and immunological Factors in Human Resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunological investigations**, 1992.

DUNNE, D.W.; HAGAN,P.; ABATH,F.G.C. Prospects for immunological control of schistosomiasis. **The Lancet**, n. 345, p. 1488-1492, 1972.

FLORENZANO, T. G; 2002. **Imagens de satelite para estudos ambientais /Sao Paulo** : Oficina de Textos, 97 p., 2002.

HOMEIDA, M.; AHMED, S.; DAFALLA, A.; SULIMAN, S.; ELTOM, I.; NASH, T.; BENNETT, J. L.. Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection as determined by ultrasound: a study in Gezira, Sudan. **Am J Trop Med Hyg.** 39: 196-201. 1988.

HOMEIDA, M.; ABDEL-GADIR, A. F.; CHEEVER, A. W. ; BENNETT, J. L.; ARBAB, B. M.; IBRAHIUM, S. Z.; ABDEL-SALAM, I. M.; DAFALLA, A. A.; NASH, T. E.. Diagnosis of pathologically confirmed Symmers' periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. **Am J Trop Med Hyg.** 38: 86-91. 1988.

IAROTSKI, L. S.; DAVIS, A. The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire survey. **Bull World Health Organ.** 59: 115-27. 1981.

INAL, J.M.; SIM, R.B.. A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. **FEBS Lett** 470: 131-134. 2000.

JESUS, A.R.; CARVALHO, L.P.. Resposta Imune às Infecções e Mecanismos Evasivos dos Agentes Infecciosos. In: COURA, J.R. (editor). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Capítulo **13**, p. 150-158. 2005.

JESUS, A.R. *et al.* Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v.72, n.6, p.3391-3397, June 2004.

JESUS, A.R. *et al.* Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura. **Am J Trop Med Hyg**, v.63, n.1-2, p.1-4, 2000.

JESUS, A.R. *et al.* Human Immune Responses to *Schistosoma mansoni*. Vaccine Candidate Antigens. **Infection and Immunity**, v.68, n.5, p. 2797-2803, 2000.

JESUS, A.R.. **Avaliação da resposta imune de indivíduos resistentes à infecção por *Schistosoma mansoni*, residentes em área endêmica de esquistossomose mansônica**. Salvador, 1998. Tese (Doutorado) da Universidade Federal da Bahia.

JESUS, A.R.J. *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis.** 2002;185(1):98-105, 2002.

JUNKER J. ECKARTDT L, HUSSTEDT I. Cervical Intramedullar Schistosomiasis as a rare caude of acute tetraparesis. **Clinival Neurology and Neurosurgical**, 103 (1): 39-42, 2001.

KATZ, N; CHAVES, A; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.14, p.397-400, 1972.

KATZ, N; PEIXOTO, S.V.. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2000; 33:303-308.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* O projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p.127-135, 1996.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, Basel, v.77, p.101-109, 2000.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p.147-150, 2001. Suplemento.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.333-337, 2004

LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, L.C.S.; VOIETA, I. Esquistossomose mansônica. In: COURA, J.R. (editor). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Capítulo **76**, p. 931-946. 2005.

MCMANUS, D. P.; ROSS, A.; WILLIAMS, G. M.; SLEIGH, A. C.; WIEST, P.; ERLICH, H.; Trachtenberg, E.; GUANLING, W.; MCGARVEY, S. T.; LI, Y. S.; WAINE, G. J.. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic schistosomiasis in a Chinese population. **Int J Parasitol.** 31: 674-80. 2001.

MARIKOVSKY, M.; ARNON, R.; FISHELSON, Z.; Proteases secreted by transforming aschistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. **J. Immunol** 141: 273 – 278. 1998.

MARINHO, C. C.. Comparação do exame clínico e da avaliação ultra-sonográfica qualitativa (palpação pelo ultra-som) com a medida do fígado e do baço no diagnóstico

da esquistossomose mansônica. Belo Horizonte, 2006. Dissertação.(mestrado) de Universidade Federal de Minas Gerais.

MCKERROW, J.H.; KEENE, W.E.; JEONG, K.H.; WERB, Z.. Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. **Lab Invest** 49: 195 – 200. 1983.

MESQUITA, G.V.; BRANDT, C.T.; SANTOS, S. M.; MARICEVICH, J. P. B. R. . Avaliação de pacientes esquistossomóticos quanto ao conteúdo mineral ósseo, nível de magnésio corporal total e atividade da enzima lecitina: colesterol acetiltransferase em pós-esplenectomizados com auto-implante esplênico. **Revista Brasileira de Ortopedia**: Pernambuco, 2004. 39(1/2):49-58

MURPHY, Kenneth; *et al.* **Imunobiologia de Janeway**. 7ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MWATHA, J.K. *et al.* High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v.160, n.4, p.1992-1999, Feb. 1998.

MS (Ministério da Saúde). **Controle da esquistossomose: guia texto**. Brasília: Superintendência de campanhas de Saúde Pública. 1998.

MS (Ministério da Saúde). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Secretaria de Vigilância Epidemiológica, 2005.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

Niamey Working Group 2000. **Ultrasound in schistosomiasis**. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis related morbidity.

World Health Organization/TDR/SCH/ULTRASON/document. Geneva, Switzerland [in press].

PARIZADE, M.; ARNON, R.; LACHMANN, P.J.; FICHELSON, Z.. Functional and antigenic similarities between a 94-kD protein of *Schistosoma mansoni* (*SCIP-1*) and human CD-59. **J Exp Med** 179: 1625 – 1636. 1994.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1978.

PRATA, A. & ANDRADE, Z. Fibrose hepática de Symmers sem esplenomegalia. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v.63, n.3, p.617-623, 1963.

RAMASAWMY, R.; MENEZES, E.; MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA J.; CASTELLUCCIA, L.; ALMEIDA, R.; JESUS, A.. The - 2518 bp promoter

polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, genetic e evolution**, 2010.

RIHET, P. *et al.* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol**, v.21, n.11, p.2679-2686, 1991.

ROLLEMBERG, C.V.V.; JESUS, A.M.R. e cols.. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo helmintos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(1):91-96, jan-fev, 2011.

ROLEMBERG, C.V.V.; QUINTANS, J.S.; SANTOS, R.. Avaliação do Programa de Controle de Esquistossomose no Bairro Santa Maria, Aracaju, Sergipe, sob a Perspectiva Farmacêutica. **Revista da Fapese**, v.4, n.2, p. 63-82. 2008.

SAMUELSON, J.C.; CAULFIELD, J.P.. Cercarial glycoalyx of *Schistosoma mansoni* activates human complement. **Infect Immun** 51: 181 – 186. 1986.

SANTOS, S.; BARCELLOS, C. Abordagens Espaciais na Saúde Pública. In: CRUZ, MdSFO, editor. **Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

SECOR, W. E.; DEL CORRAL, H.; DOS REIS, M. G.; RAMOS, E. A.; ZIMON, A. E.; MATOS, E. P.; Reis, E. A.; DO CARMO, T. M.; HIRAYAMA, K.; DAVID, R. A.; David, J. R.; HARN JR., D. A.. Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. **J Infect Dis**. 174: 1131-5. 1996.

SILVA, A.M.. **Avaliação de um surto de esquistossomose mansônica aguda com seus aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos**. São Paulo, 2001. Tese (Doutorado) da Universidade Federal de São Paulo.

SILVA, P.. A Schistosomose na Bahia (Estado atual da questão). *Gazeta Mercantil da Bahia*. 1947.

SLEIGH, A.C. *et al.* Three-year prospective study of the evolution of Manson's schistosomiasis in north-east Brazil. **Lancet**, v.2, n.8446, p.63-66, 1985.

SPRING. Menu de Ajuda: Informações Conceituais. Spring, v.3.4. **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE**, 2003.

STADECKER, M.J., SMITH, P. M., SHAINHEIT, M. G., BAZZONE, L. E., RUTITZKY, L. I., POLTORAK A. Genetic Control of Severe Egg-Induced Immunopathology and IL-17 Production in Murine Schistosomiasis. **The journal of immunology**: 2009.

STADECKER, M.J., RUTITZKY, L. I. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro: 2006

STADECKER, M.J., SMITH, P. M., RUTITZKY, L. I. T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17 cell-mediated inflammation. **The Journal Immunology**: 2009.

THOMÉ, Rogério. **Interoperabilidade em Geoprocessamento**: conversão entre modelos conceituais de sistemas de informação geográfica e comparação como padrão open GIS. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, São José dos Campos, 1998.

VELWAERDE, C.; AURIAULT, C.; NEYRINK, J. L.; CAPRON, A.. Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. **Scand J Immunol** 27: 17 – 24.

WARREN, K.S. Hepatosplenic Schistosomiasis mansoni: An Immunological Disease. **Bull N Y Acad Med.**, v.51, n.4, p.545-549, 1975.

WILSON, S. *et al.* Hepatosplenomegaly is associated with low regulatory and Th2 responses to schistosome antigens in childhood schistosomiasis and malaria coinfection. **Infect Immun**, v.76, n.5, p.2212-2218, may. 2008.

WILSON, S. *et al.* Health implications of chronic hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children chronically exposed to malarial infections and *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** February ; 104(2): 110–116, 2010.

WILSON S. *et al.* Hepatosplenomegaly in Kenyan schoolchildren: exacerbation by concurrent chronic exposure to malaria and *Schistosoma mansoni* infection. **Trop Med Int Health**. Dec; 12(12):1442-9, 2007.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: Influência de aspectos Ambientais, Imuno-parasitológicos e Patogênicos envolvidos com a Esquistossomose na região endêmica de Ilha das Flores/SE

NOME DO PACIENTE: _____

Investigador Principal: Amélia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracaju,-Brasil., Tel: (79)2105-1811.

Nº do Projeto: _____

Convite e Objetivo:

Você (ou seu filho(a)) é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo ver o número de casos de esquistossomose no Estado de Sergipe, fazendo uma relação com a renda das pessoas, o grau de escolaridade e a gravidade da doença. Este estudo incluirá pessoas de uma determinada região com grande número de casos de esquistossomose. A sua região foi escolhida por ter muitos casos da doença. Além das informações deste documento você (ou seu filho(a)) pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você (ou seu filho(a)) será solicitado(a) a assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua (ou seu filho(a)) participação é voluntária. Você (ou seu filho(a)) pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após ter aceitado

participar, resolva desistir de participar, isto será feito sem qualquer prejuízo para você (ou seu filho(a)).

Finalidade do estudo: Este estudo vai ver a gravidade da esquistossomose, relacionando com a proximidade dos rios e lagos, assim como analisar como a esquistossomose influencia o quadro clínico de outras doenças (alergias, doenças causadas por vírus e doenças autoimunes). Para isto você (ou seu filho(a)) precisará responder a alguns questionários, ser examinado pelo médico e fazer alguns exames complementares.

Procedimentos: Caso você (ou seu filho(a)) concorde em participar do estudo, além de responder a diversas perguntas, você (ou seu filho(a)) será examinado por um médico clínico e precisará fazer alguns exames, como exames de fezes, de sangue e ultrassonografia da barriga para que se possa ter uma idéia de como está o grau da sua doença (ou seu filho(a)), caso esta seja diagnosticada. Seu soro e material genético (DNA) extraído do seu sangue (ou seu filho(a)) será estocado para estudar posteriormente se existe um fator transmitido na sua família que predisponha à doença ou aumente a gravidade desta. **Este material será estocado e utilizado apenas para fins de pesquisa e só será utilizado para pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética.**

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação (ou seu filho(a)) no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de avaliação. Periodicamente, você (ou seu filho(a)) será examinado para determinar a progressão da doença. Caso você (ou seu filho(a)) desista de participar do estudo, todo o seu material (ou seu filho(a)) será descartado.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas

(Comitê de ética do Hospital Universitário). Você (ou seu filho(a)) e qualquer participante desse estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica (ou seu filho(a)).

Análises de riscos e benefícios: Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. O tratamento que você (ou seu filho(a)) receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará (ou seu filho(a)) como benefício um acompanhamento clínico mais freqüente. Você (ou seu filho(a)) receberá o aviso para ir ao posto de saúde da sua cidade nos dias em que você (ou seu filho(a)) será examinado ou o visitaremos em sua casa, caso seja necessário. Alguns exames serão realizados aí mesmo, na sua cidade e alguns serão feitos no Hospital Universitário, em Aracaju, então um carro levará você (ou seu filho(a)) até o local de realização do exame (seu filho menor de 18 anos só irá após sua autorização e acompanhado por um responsável maior de 18 anos).

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: Este projeto vai dar informações dos lugares onde é mais fácil contrair a Esquistossomose no Estado de Sergipe. Estes dados poderão, então, ser utilizados para elaborar maneiras de prevenir a doença em regiões com maior risco, mesmo que ainda não apresentem casos da doença, bem como realização de campanhas educativas nas escolas.

Custos: Você (ou seu filho(a)) não terá custos com o tratamento da esquistossomose. Você (ou seu filho(a)) não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você (ou seu filho(a)) precise de esclarecimento sobre o estudo, você pode contatar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)8823-7245 Dra. Amélia

Ribeiro de Jesus ou Dr. Roque Almeida (79)8823-7244 ou (79)2105-1811. Caso você (ou seu filho(a)) seja acometido de outras doenças que precisem de tratamento, a equipe médica irá prescrevê-lo, porém não se responsabilizará com os custos do seu tratamento. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você (ou seu filho(a)) leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você (ou seu filho(a)) concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Caso você (ou seu filho(a)) concorde que parte do material coletado de seu sangue (soro e DNA) (ou seu filho(a)) seja estocado para estudos posteriores aprovados por este Comitê de Ética, marque abaixo:

() SIM. Concordo que meu soro e DNA (ou meu filho(a)) sejam estocados

() NÃO concordo que meu soro e DNA (ou meu filho(a)) sejam estocados

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão digital do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura ou impressão digital do responsável	Data	Hora
(Em caso de menores de 18 anos)		
_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

APÊNDICE II

QUESTIONÁRIO

Avaliação do Impacto da Esquistossomose no Estado de Sergipe utilizando Geoprocessamento, focalizando os Aspectos Geo-ambientais, Socioeconômicos, Culturais, e suas Influências na morbidade da doença.

1. N^o Estudo: ____ - ____

IDENTIFICAÇÃO

2. Data de Nascimento ____/____/____ (dd/mm/aaaa)		3. Idade: ____ anos ou ____ meses	4. Sexo: <input type="checkbox"/> F (1) <input type="checkbox"/> M (2)
5. Raça: <input type="checkbox"/> branca(1) <input type="checkbox"/> negra(2) <input type="checkbox"/> parda(3) <input type="checkbox"/> indígena(4)			
6. Ocupação:		7. Estado Civil: <input type="checkbox"/> S (1) <input type="checkbox"/> C (2) <input type="checkbox"/> D (3) <input type="checkbox"/> V (4)	
8. Endereço:			
9. Telefone:			
10. Relação de Parentesco: <input type="checkbox"/> Mãe(1) <input type="checkbox"/> Pai (2) <input type="checkbox"/> Irmão (3) <input type="checkbox"/> Primo (4) <input type="checkbox"/> Tio (5) <input type="checkbox"/> Avô/Avó (6) <input type="checkbox"/> Esposa (7) <input type="checkbox"/> NR (8)			
11. Família de Relação ____ - ____			
12. Naturalidade:		UF:	
13. Tempo de Moradia: ____ anos ____ meses			

Dados Epidemiológicos e Sócio-econômico-culturais

14. Escolaridade: <input type="checkbox"/> Analfabeto (1)	
<input type="checkbox"/> Ensino fundamental completo (2) <input type="checkbox"/> Ensino fundamental incompleto (3) <input type="checkbox"/> Ensino médio completo (4)	
<input type="checkbox"/> Ensino médio incompleto(5) <input type="checkbox"/> Ensino superior completo (6) <input type="checkbox"/> Ensino superior incompleto(7)	
<input type="checkbox"/> Outro (9): _____	
15. Água Encanada: <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> Sim, mas falta com frequência(3) <input type="checkbox"/> Não Informado (4)	
16. Luz Elétrica: <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> Não Informado(3)	
17. Renda Familiar: <input type="checkbox"/> ≤1SM (1) <input type="checkbox"/> 1 a 3SM (2) <input type="checkbox"/> 4 a 7SM (3) <input type="checkbox"/> >7SM(4)	
18. Esgotamento ou fossa: <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> Não Informado(3)	
19. Residência: <input type="checkbox"/> Própria (1) <input type="checkbox"/> Alugada (2)	
20. Tipo de Casa: <input type="checkbox"/> Madeira(1) <input type="checkbox"/> Taipa(2) <input type="checkbox"/> Tijolo sem reboco(3) <input type="checkbox"/> Tijolo com reboco(4)	
21. No de Cômodos na casa: <input type="checkbox"/> 1 (1) <input type="checkbox"/> 2 (2) <input type="checkbox"/> 3 (3) <input type="checkbox"/> ≥ 4 (4)	
22. No de Filhos: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
23. Contato com a água/atividades: 1 <input type="checkbox"/> Sim 2 <input type="checkbox"/> Não	
Atividades	Tempo de Contato com a Água
24. <input type="checkbox"/> Lavoura <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
25. <input type="checkbox"/> Lavar carro/animais <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
26. <input type="checkbox"/> Lavar roupas <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
27. <input type="checkbox"/> Lavar pratos/panelas <input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
28. <input type="checkbox"/> Banho/Lazer <input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
29. <input type="checkbox"/> Lavar Cabelos <input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
30. <input type="checkbox"/> Pescar <input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não (2)	____ hrs ____ min
31. Grau de Contato com a água (Preencher com base na pergunta 10.9 após somar os tempos de exposição)	

Grau 0 (Nenhum Contato) (1) Grau I (Baixo Grau: < 1 h/ semana) (2)

Grau II (Intermediário: 1-6h/ semana) (3) Grau III (Alto Grau: > 6 horas/ semana) (4)

32. Proximidade da casa com a fonte hídrica (Medida pelo GPS): _____

Detecção de Doenças Associadas

33. Artrite:	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> Não Informado (3)
34. Rigidez matinal:	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> Não Informado (3)
35. Tem ou teve doença na tireóide:	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> Não Informado (3)
36. Tem História de Diabetes:	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> Não Informado (3)
Hábitos de vida:	
37. Etilismo:	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> Não Informado(3) Frequência _____ Tempo _____ anos _____ meses
38. Tabagismo:	1 <input type="checkbox"/> Sim 2 <input type="checkbox"/> Não 3 <input type="checkbox"/> Não Informado Nº cigarros/dia _____ Tempo _____ anos _____ meses

Exame Físico

Avaliação da Forma Clínica da Doença	
39. Fígado:	<input type="checkbox"/> Impalpável (1) <input type="checkbox"/> Palpável no RCD (2) <input type="checkbox"/> Abaixo do RCD (3) <input type="checkbox"/> Abaixo do AX (4)
40. Tamanho do Fígado (cm do RCD):	□□□

41. Tamanho do fígado (cm do AX)	□□□
42. Baço:	<input type="checkbox"/> Impalpável (1) <input type="checkbox"/> Palpável no RCE (2) <input type="checkbox"/> Abaixo do RCE (3)
43. Tamanho do baço (cm do RCE):	□□

ISAAC	
Detecção de Doenças Alérgicas	
44. Alguma vez na vida, você teve sibilos (chiado no peito)?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 49.
45. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito) ?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 49.
46. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?	<input type="checkbox"/> Nenhuma crise <input type="checkbox"/> 1 a 3 crises <input type="checkbox"/> 4 a 10 crises <input type="checkbox"/> mais de 12 crises
47. Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?	<input type="checkbox"/> Nunca acordou com chiado <input type="checkbox"/> Menos de 1 noite por semana <input type="checkbox"/> Uma ou mais noites por semana
48. Nos últimos 12 meses seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
49. Alguma vez na vida você teve asma?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

50. Nos últimos 12 meses você teve chiado no peito após exercícios físicos?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
51. Nos últimos 12 meses você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
RINITE (13 A 14 anos) OBS: Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado!	
52. Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), quando não estava resfriado ou gripado?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 57.
53. Nos últimos 12 meses você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado ou resfriado?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 57.
54. Nos últimos 12 meses esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
55. Em qual dos últimos 12 meses esse problema nasal ocorreu? (por favor, marque em qual ou quais meses isso ocorreu).	<input type="checkbox"/> Janeiro <input type="checkbox"/> Maio <input type="checkbox"/> Setembro <input type="checkbox"/> Fevereiro <input type="checkbox"/> Junho <input type="checkbox"/> Outubro <input type="checkbox"/> Março <input type="checkbox"/> Julho <input type="checkbox"/> Novembro <input type="checkbox"/> Abril <input type="checkbox"/> Agosto <input type="checkbox"/> Dezembro
56. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esse problema nasal?	<input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Muito
57. Alguma vez na vida você teve rinite alérgica?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
DERMATITE ATÓPICA	
58. Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos seis	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 62.

meses?	
59. Nos últimos 12 meses você teve essas manchas na pele (eczema)?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se a resposta for não, passe para a questão 62.
60. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
61. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
62. Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa de coceira na pele?	Nunca nos últimos 12 meses <input type="checkbox"/> Menos de 1 noite por semana <input type="checkbox"/> Uma ou mais noites por semana <input type="checkbox"/>
63. Alguma vez você teve eczema?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

Exames Complementares

Hemograma:	
Parasitológico de fezes (Kato-Katz):	
Glicemia de jejum:	
Fator Reumatóide:	
Fator Antinuclear:	
Proteína C Reativa:	

