

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES**  
**Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde**

Rodrigo Moraes Loyo

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA EM MODELO ANIMAL**

**RECIFE**  
**2018**

Rodrigo Moraes Loyo

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao curso Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Constança Simões Barbosa

Coorientador: Dr Augusto Simoes-Barbosa

Recife

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

L923a	<p>Loyo, Rodrigo Moraes Avaliação do Perfil Metabólico da Esquistossomose Mansônica em Modelo Animal / Rodrigo Moraes Loyo. Recife: s.n, 2018 67 p. : ilus., tab., graf.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018. Orientadora: Constança Simões Barbosa; coorientador: Augusto Simoes-Barbosa</p> <p>1. Esquistossomose. 2. Metabólica. 3. Biomarcadores. 4. Schistosoma mansoni – parasitologia. I. Barbosa, Constança Simões. II. Simoes-Barbosa, Augusto. III. Título.</p>	CDU 616.955.
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------

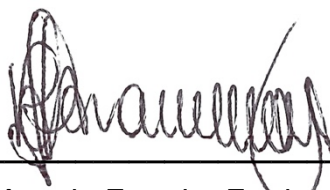
Rodrigo Moraes Loyo

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de Aprovação: 27 / 03 / 2018

**Banca Examinadora**



---

Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo  
Universidade Federal de Pernambuco  
Deptº de Bioquímica



---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Deptº de Parasitologia



---

Drª. Constança Simões Barbosa  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Deptº de Parasitologia

*“ Compreender que há outros pontos de vista é  
o início da sabedoria. ”*  
- Thomas Campbel

LOYO, Rodrigo Moraes. **Avaliação do Perfil Metabolômico da Esquistossomose Mansônica em Modelo Animal**. 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A esquistossomose é uma doença negligenciada extremamente relevante para a saúde pública mundial tendo em vista os elevados números de óbitos causados por essa verminose. Há uma emergente área de pesquisa visando biomarcadores que proporcionem uma melhor sensibilidade no diagnóstico. O estudo da metabolômica é uma forte ferramenta utilizada para determinação de marcadores biológicos. **OBJETIVO:** identificar um padrão de metabólitos para infecção de baixa carga parasitária pelo *Schistosoma mansoni*. **METODOLOGIA:** foram utilizados 3 grupos de camundongos, sendo um de alta carga parasitária, baixa carga e negativo. Todos os animais foram submetidos a exame parasitológico para determinação da carga parasitária. Foram coletadas amostras de urina para determinação do perfil metabolômico dos grupos de estudo. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) foi utilizada para determinar a identidade dos metabólitos presentes nas urinas. **RESULTADOS:** Mais de 230 metabólitos foram detectados, sendo 5 desses (ácido hipúrico, malonato, glicina, alanina e ureia) correlatos com a carga parasitária dos grupos de estudo. O malonato e o ácido hipúrico decaíram à medida que a carga parasitária se elevou, já a alanina, glicina e ureia se elevam quando a carga parasitaria é maior. **CONCLUSÃO:** Esse estudo possibilitou de forma significativa a identificação de metabólitos associados a baixa parasitemia em murinos com esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose. Metabolômica. Biomarcadores.

LOYO, Rodrigo Moraes. **Using metabolomics to identify biomarkers in animal models of *Schistosoma mansoni* infection**. 2018. Thesis (Master's Degree in Bioscience and Health Biotechnology) – Institute Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** The Schistosomiasis is a neglected disease and very relevant to global public health taking into account the high levels of morbidity caused by this parasite. To improve diagnostic sensitivity over the conventional tests, an emerging area aims diagnostic using biomarkers based on disease-specific metabolites. **OBJECTIVE:** identify a profile of metabolites for Schistosomiasis when in low parasite load. **METHODOLOGY:** Three mouse study groups were used: high parasite load, low parasite load and a no-infection group (negative control). All animals underwent stool examination to determine the parasitic load. Urine samples were collected from each of the study groups to determine the metabolic profile. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the identity and the relative quantification of the metabolites present in the samples. **RESULTS:** more than 230 metabolites were listed under the groups, being five of these (Hippuric acid, malonic acid, alanine, glycine and urea) correlated with the parasitological load. While malonic acid and hippuric acid are inversely related to the parasitic load levels of alanine, glycine and urea rise along with the parasitic load. **CONCLUSION:** This study allowed the identification of metabolites significantly associated with low parasitemia of murine Schistosomiasis.

keywords: Schistosomiasis. Metabolomics. Biomarkers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cordel representando o ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	17
Figura 2 - Analogia entre as fases da vida humana e os estágios de desenvolvimento do <i>S. mansoni</i> .....	19
Figura 3 - Fluxograma da divisão dos grupos de estudo e fluxo dos procedimentos com as amostras .....	26
Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos de metabolômica com as amostras de urina dos animais dos grupos de estudo .....	26
Figura 5 - Visualização dos aspectos macroscópicos de órgãos do animal de número 6 do grupo de baixa carga parasitária (LPL).....	37
Figura 6 – Comparação da carga parasitológica de <i>S. mansoni</i> dos grupos NI, LPL e HPL.....	38
Figura 7 - Visualização da análise por PCA nas amostras de urina derivatizadas e processadas por GC-MS. ....	40
Figura 8 - Identificação dos metabólitos com diferença significativa entre os grupos de estudo.....	43
Figura 9 - Cromatograma de massa evidenciando os metabólitos com diferença significativa. ....	48
Quadro 1 - Comparativo dos metabólitos significantes entre os grupos de animais infectados com <i>S. mansoni</i> (HPL e LPH) com o não infectado (NI). ....	48
Figura 10 - Regressão linear (negativa) com os dados de correlação entre abundância relativa dos metabólitos malonato e ácido hipúrico e OPG dos animais do grupo HPL e LPL. ....	50
Figura 11 - Regressão linear (positiva) com os dados de correlação entre abundância relativa dos metabólitos alanina e glicina e OPG dos animais do grupo HPL e LPL. ....	51
Figura 12 - Regressão linear (positiva) evidenciando a correlação entre abundância relativa da Ureia e a carga parasitária dos grupos infectados (HPL e LPL).....	52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstrativo da carga parasitária em OPG de cada animal dos grupos de estudo. ....	36
Tabela 2 - Repetição do exame parasitológico nos animais negativos do grupo de baixa carga parasitária (LPL) para confirmação da infecção. ....	36
Tabela 3 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por MCF e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabolito encontrado e a biblioteca analisada).....	41
Tabela 4 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por TMS e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabolito encontrado e a biblioteca analisada).....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS & SIGLAS

AMDIS	- <i>Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
CE-MS	- <i>Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry</i>
CI	- Ionização Química
EI	- Ionização por Elétron
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i>
GC-MS	- <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HPL	- Grupo de Alta Carga Parasitária
LC-MS	- <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
LE	- Cepa Luiz Evangelista de <i>Schistosoma mansoni</i>
LIF	- Fluorescência Induzida por Laser
LPL	- Grupo de Baixa Carga Parasitária
M	- Concentração Molar
MALDI	- <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MCF	- Derivatização por Cloroformato de metilo
MS	- Espectrometria de Massa
NI	- Grupo de Animais Não Infectados
NMR	- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
OPG	- Ovos por Grama de Fezes
PCA	- Análise de Componente Principal
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RPM	- Rotações por minuto
SIMS	- Espectrometria de Massa por Ionização Branda
TMS	- Derivatização por Trimetilsililo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 A esquistossomose .....	16
2.2 Desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	17
2.3 Métodos de diagnóstico .....	19
2.4 Metabolômica .....	21
3 JUSTIFICATIVA .....	24
4 OBJETIVO GERAL .....	25
4.1 Objetivos específicos .....	25
5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO .....	26
6 METODOLOGIA PARA O OBJETIVO ESPECIFICO 1: <b>QUANTIFICAR A CARGA PARASITÁRIA DOS GRUPOS DE ESTUDO</b> .....	27
6.1 Grupos de estudo .....	27
6.2 Infecção dos grupos de estudo .....	27
6.3 Coleta das amostras biológicas .....	28
6.3.1 Urina .....	28
6.3.2 Fezes .....	29
6.4 Análise parasitológica .....	29
6.5 Confirmação da infecção .....	29
7 METODOLOGIA PARA O OBJETIVO ESPECIFICO 2: <b>IDENTIFICAR O METABÓLITOS DE INTERESSE COMO POTENCIAIS MARCADORES BIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO S. MANSONI</b> .....	31
7.1 Determinação do metaboloma .....	31
7.1.1 Preparação das amostras .....	31
7.2 Análise dos dados gerados .....	33
8 HIPÓTESE DO ESTUDO .....	34
9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	35
10 RESULTADOS .....	36
10.1 Objetivo específico 1: Quantificar a carga parasitária dos grupos de estudo .....	36

<b>10.2 Objetivo específico 2: Identificar metabólitos de interesse como potenciais marcadores biológicos da infecção por S. mansoni</b> .....	38
<b>11 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>12 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose tem como agente causador um parasita digenea do gênero *Schistosoma*. Os schistossomas são metazoários acelomados e possuem dimorfismo sexual quando adultos. Há varias espécies existentes, mas só três de grande interesse para saúde humana, *Schistosoma japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni*, todas com características peculiares de fisiologia, morfologia e ciclo de vida (ROLLINSON; SIMPSON, 1987).

A parasitose é abrangente e estabelecida em vários continentes, sendo muito relevante para a saúde pública mundial. Estima-se que mais de 95% das pessoas infectadas com esquistossomose estão concentradas na África, o que pode ser explicado pelas condições socioeconômicas e culturais do continente (HOTEZ; FENWICK, 2009; UTZINGER et al., 2009). Nas Américas, o Brasil é o país mais prevalente, sendo o *S. mansoni* o parasita responsável pela esquistossomose intestinal em diversas áreas do território nacional (STEINMANN et al., 2006). Segundo a vigilância epidemiológica as áreas endêmicas importantes no país abrangem os estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Alagoas, Espírito Santo, Sergipe, Bahia e Pernambuco sendo este um dos estados com maiores índices de prevalência, casos agudos e formas graves da doença (BARBOSA et al., 2004, 2010, 2016; GOMES et al., 2012).

O teste padrão ouro preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico parasitológico da esquistossomose intestinal é a visualização de ovos viáveis do *S. mansoni* nas fezes de indivíduos parasitados (FELDMEIER; POGGENSEE, 1993). O método de Kato-Katz é uma técnica simples, possui kits para sua realização e consiste na detecção direta de ovos e na sua quantificação, determinando a carga parasitária dos pacientes. É o método de diagnóstico mais utilizado em inquéritos epidemiológicos devido a facilidade de preparação do exame, estocagem das lâminas e detecção da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* nas comunidades afetadas pela doença. A técnica deve ser utilizada após dois meses da infecção, período de tempo que corresponde ao desenvolvimento dos vermes até a fase adulta e começa a oviposição (GRAY et al., 2011).

No entanto, há dois fatores a serem considerados para o uso do método de Kato-Katz: quantificação da excreção dos ovos e a consistência do material fecal (BOUT;

SANTORO; CAPRON, 1975; HOSHINO-SHIMIZU et al., 1986). Existe uma flutuação diária na excreção dos ovos nas fezes e também há uma distribuição desigual dos ovos ao longo do material fecal (BARRETO; SMITH; SLEIGH, 1990; DE VLAS et al., 1997). Estudos apontam que amostras de fezes mais secas podem ter contagem de ovos até sete vezes maior que uma amostra úmida do mesmo paciente (HAGAN; ABATH, 1992). A técnica não é muito recomendada para áreas de baixa carga parasitária (menos de 100 ovos por grama de fezes) tendo em vista que o volume amostral do kit Kato-Katz (cerca de 42 mg de fezes) é muito pouco o que acaba dificultando encontrar os ovos nas fezes (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

O diagnóstico imunológico laboratorial da esquistossomose consiste na detecção de antígenos solúveis, tanto do verme como do ovo, por meio de técnicas como o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). No entanto, esses métodos não possuem sensibilidade e especificidade para um diagnóstico definitivo (MIDZI et al., 2009; SHANE et al., 2011). Os testes de diagnóstico molecular, principalmente a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), estão em constante progresso para otimização da sensibilidade e especificidade (OLIVEIRA et al., 2010).

Há uma emergente linha de pesquisa focada na busca de novos biomarcadores para o diagnóstico, estadiamento ou seguimento da patologia, devido à deficiência de testes efetivos para um diagnóstico da esquistossomose em áreas com baixa carga parasitária. A caracterização metabólica de pacientes com determinadas patologias pode ajudar na determinação das funcionalidades gênicas, descoberta de novos biomarcadores e estabelecimento seguro de fármacos (HOLMES, 2010; NICHOLSON et al., 2002).

A metabolômica é uma ferramenta centrada na análise dos metabólitos e se utiliza de equipamentos robustos com ferramentas analíticas (Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear, Técnicas cromatográficas) e análises estatísticas multivariadas sendo capaz não só de determinar, mas também quantificar os metabólitos secundários em estudo de maneira relativa entre as amostras do estudo (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). O nível desses metabólitos no organismo representa informações da função celular e, portanto, define o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações genéticas ou ambientais (FIEHN, 2001).

Os métodos de análise ao nível da transcrição (transcriptoma) e ao nível de tradução (proteoma) estão atualmente num estado de rápido desenvolvimento.

Métodos analíticos de alto rendimento (padronização da técnica) para essas tecnologias já estão sendo utilizados, e os métodos que conduzem a análise dos metabólitos são menos comuns. Atualmente não há um método único para a análise do metaboloma, mas essa técnica está expandindo suas aplicabilidades. A metabolômica possibilita identificar e comparar a atividade de expressão gênica entre organismos tratados com condições diferentes bem como avaliar e identificar marcadores biológicos e até mesmo determinar alvos de medicamentos e vacinas (HOLMES, 2010).

Nesta linha de pesquisa, trabalhos usando modelo de esquistossomose começaram em 2004 e os mais recentes publicados datam de 2011. Esses trabalhos utilizaram técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e eletroforese em capilar para avaliar os metabólitos de seus grupos de estudo (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008, 2010; LI et al., 2011; WANG et al., 2004).

Apesar desta ferramenta de pesquisa exigir recursos tecnológicos sofisticados e caros, o que dificulta seu acesso nos países ainda em desenvolvimento e afetados pela parasitose, o perfil metabólico é um dado de extrema importância para a seleção de marcadores biológicos para o diagnóstico precoce de determinados agravos à saúde (WANG et al., 2010). Além disso, o perfil metabólico pode ajudar a entender a resposta metabólica de um paciente a um processo infeccioso/patológico, podendo auxiliar no prognóstico e tratamento.

Tendo em vista todo o panorama em relação ao problema de diagnóstico em locais onde as técnicas atuais não possuem sensibilidade desejável, o presente estudo pretende identificar possíveis marcadores biológicos da infecção para baixa carga parasitária e assim melhorar o diagnóstico da doença.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A esquistossomose

A verminose tem como agente causador parasitos pertencentes ao filo *Platyhelminthes*, classe Trematoda, ordem Digenea, subordem Strigeidida, superfamília Schistosomatoidea, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. Os *schistosomas* são metazoários acelomados, de simetria bilateral e dimorfismo sexual durante a fase adulta. As três espécies mais importantes para a saúde pública mundial são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*, que apresentam características morfológicas e fisiológicas particulares, diferentes hospedeiros intermediários e distintas localizações no hospedeiro definitivo, além da distribuição geográfica diferente (ROLLINSON; SIMPSON, 1987).

A esquistossomose é considerada uma das doenças mais relevantes para a saúde pública mundial. Estima-se que existam 779 milhões de pessoas sob risco de infecção e 210 milhões infectadas em 76 países (STEINMANN et al., 2006). A morbidade provocada pela esquistossomose tem um grande impacto nas atividades diárias dos indivíduos infectados. Os agravantes da doença no desenvolvimento dos jovens e na produtividade dos adultos têm reflexo negativo na economia doméstica e da região. O elevado número de pessoas infectadas e os efeitos negativos da morbidade têm um impacto significativo no número de anos de vida produtiva perdida devido à esquistossomose. Este índice é ainda mais relevante para comunidades com nível socioeconômico baixo, o que justifica os esforços para o melhor entendimento da doença e para a busca de soluções adequadas como educação em saúde e medidas de saneamento básico (KING et al., 2006).

Apesar de Pernambuco apresentar redução nas internações hospitalares por esquistossomose no período dos anos 90, ainda exibe um alto percentual em relação ao total de internações (5,81%), o que evidencia a gravidade do problema no Estado (BARBOSA et al., 2016; RESENDES; SOUZA-SANTOS; BARBOSA, 2005). A baixa escolaridade do chefe da família, o número de pessoas por domicílio e a baixa condição financeira da família são considerados fatores de risco para esquistossomose (GAZZINELLI et al., 2006).

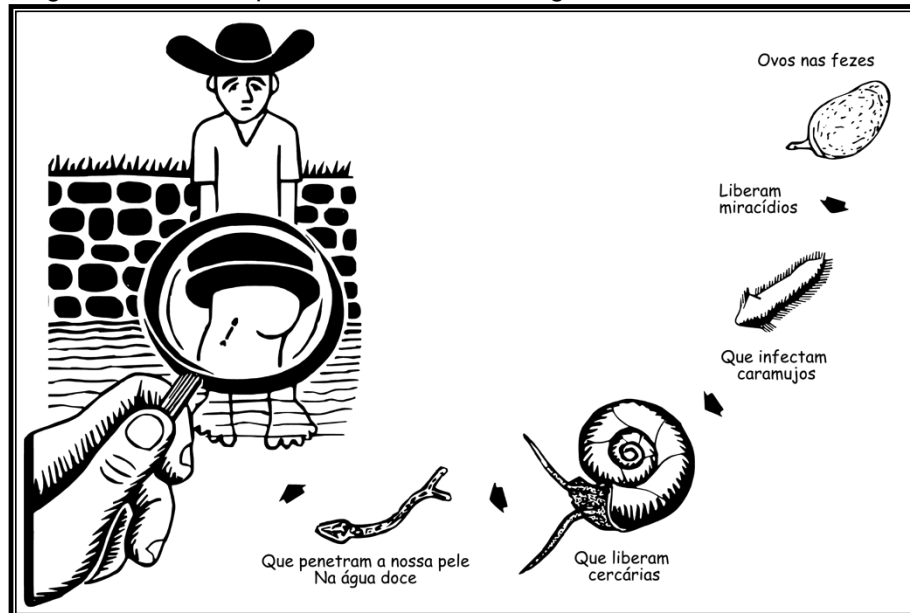


## 2.2 Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

O agente causador da esquistossomose foi descoberto em 1815. Em 1913 o hospedeiro intermediário foi identificado e o ciclo de vida do parasito descrito e reproduzido em laboratório (KATZ, 2008).

O ciclo de vida do *S. mansoni*, espécie causadora da esquistossomose no Brasil, envolve duas gerações: a primeira no hospedeiro definitivo vertebrado, onde ocorre a maturação do verme e reprodução sexuada; e a segunda no hospedeiro intermediário invertebrado, onde ocorre a reprodução assexuada (Figura 1).

Figura 1 - Cordel representando o ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Adaptado de Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (2015).

Os ovos eliminados através das fezes do hospedeiro definitivo eclodirão, se encontrarem condições apropriadas como água limpa com temperatura adequada, iluminação incidente e baixa hipotonicidade. Uma vez que o ovo é rompido, os miracídeos emergem e começam a nadar ativamente. O encontro com o hospedeiro intermediário deve ocorrer em um período de 24 horas, caso contrário o miracídeo irá esgotar suas reservas energéticas. Após a penetração do miracídeo no caramujo por volta do oitavo dia, este se apresenta como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação, se transformando em esporocisto primário. Por volta da segunda semana, o esporocisto primário rompe-

se para liberar esporocistos secundários. Os esporocistos podem formar várias gerações de cercárias. Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto no hospedeiro intermediário, que as libera de forma intermitente na água. As cercárias deixam o hospedeiro intermediário através da formação de vesículas no epitélio do manto e da pseudobrânquia do molusco sendo liberado na água (ROLLINSON; SIMPSON, 1987).

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são os caramujos do gênero *Biomphalaria* (GRYSEELS et al., 2006). Quando as cercárias encontram um hospedeiro definitivo apropriado liberam as secreções da glândula acetabular, facilitando a sua penetração pela epiderme e iniciando o processo de transformação em esquistossômulos (WILSON; COULSON, 1986). Os esquistossômulos permanecem na epiderme por cerca de 53 horas, na derme por volta de 18 horas e levam em média 8 horas para penetrar em uma vênula (WILSON; LAWSON, 1980). Através da circulação, chegam aos pulmões em 2 a 7 dias (WILSON; COULSON, 1986). Do pulmão, os esquistossômulos são enviados ao coração e, de lá, pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro definitivo. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento (MILLER; WILSON, 2009). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas pélvicas (BLOCH, 1980).

O casal está em constante associação, encontrando-se a fêmea no canal ginecóforo do macho. A fêmea depende do contato com o macho para completar a sua maturação (LOVERDE; CHEN, 1991). A produção de ovos começa cerca de 30 a 40 dias após a infecção e os mesmos são movidos ativamente para o lúmen do intestino, sendo eliminados para o ambiente através das fezes do hospedeiro definitivo infectado (ROLLINSON; SIMPSON, 1987) e fechando assim o ciclo de vida do parasito (Figura 2).

Figura 2 - Analogia entre as fases da vida humana e os estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*



Fonte: Wikipedia (TREMATODE ..., 2016).

### 2.3 Métodos de diagnóstico

A esquistossomose foi descrita pela primeira vez em 1852 por um jovem alemão que na época era assistente do diretor do departamento de higiene no Cairo, Egito (TAN et al., 2007). Sendo identificada por meio da necropsia do paciente, efetuando biopsia de diversos órgãos. Depois de 56 anos desse primeiro achado, Pirajá da Silva reportou pela primeira vez no Brasil a esquistossomose (PIRAJÁ DA SILVA, 1908) e ajudou na elucidação da existência de espécies diferentes e que os ovos dessas espécies também são diferentes. Em 1919 o médico carioca Adolpho Lutz desenvolveu uma série de modificações no método parasitológico (sedimentação espontânea) de diagnóstico da esquistossomose (COURA; AMARAL, 2004).

Nessa mesma época vários pesquisadores caminhavam no desenvolvimento de diversos tipos de diagnóstico para a esquistossomose. Na área da imunologia a reação de fixação do complemento foi amplamente descrita por diversos grupos no Japão (FUJINAMI; NAKAMURA, 1909; SUEYASU, 1916; YOSHIMOTO, 1910). Atualmente existem uma ampla variedade de reações imunológicas (ELISA, Reação intradérmica, teste de aglutinação de cercárias, radioimunoensaio, etc) para detectar

a esquistossomose, mas muitos deles não apresentam ou tem valor de diagnóstico limitado para a doença. O grande problema dos testes imunológicos é não possuir a capacidade de diferenciar entre uma infecção passada (paciente já tratado) e recente (paciente ainda infectado), apresentando resultado positivo mesmo pós-tratamento e muito não conseguem diferir a infecção por outros helmintos resultando em diversas reações cruzadas (MONTENEGRO; MONTENEGRO, 1992; MOTT et al., 1987; SMITHERS; TERRY, 1976).

Na área da biologia molecular houve bons avanços quando uma pequena região extremamente repetida no genoma do *Schistosoma* foi descrita por Joseph Hamburger em 1991 (HAMBURGER et al., 1991) permitindo o desenvolvimento de um diagnóstico para a esquistossomose por meio da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) (PONTES; DIAS-NETO; RABELLO, 2002). A PCR se mostrou muito eficiente quando testada em áreas endêmicas e comparada com o diagnóstico parasitológico, chegando a ser 10 vezes mais sensível que o Kato-Katz (PONTES et al., 2003). Os principais problemas no uso dessa técnica consistem no risco da enzima utilizada na reação sofrer inibição e fator contaminação que é o grande vilão das técnicas de biologia molecular. Esses percalços da técnica podem ser facilmente resolvidos ou evitados tomando medidas de higienização e padronização dos ambientes de trabalho no caso de contaminação e pelo uso de controles internos da reação ou a própria diluição da amostra no caso de inibição enzimática (MELO et al., 2006).

O método de diagnóstico padrão ouro é o exame parasitológico de Kato-Katz, pois é uma técnica de excelente especificidade e possibilita a quantificação da carga parasitária do indivíduo acometido pela doença (FELDMEIER; POGGENSEE, 1993). Os indivíduos que apresentam até 99 ovos por grama de fezes (OPG) são classificados como baixa carga parasitária, de 100 a 500 OPG são pessoas com intensidade moderada de infecção e aqueles que possuem mais de 500 OPG têm uma infecção elevada (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

A técnica de Kato-Katz tem alguns problemas quanto a sua sensibilidade e eficácia principalmente em locais onde os indivíduos possuem baixa carga parasitária (até 99 ovos por grama de fezes por lâmina), mas continua sendo a técnica mais indicada para o diagnóstico da doença (BARRETO; SMITH; SLEIGH, 1990; RABELLO, 1997).

Várias técnicas estão em desenvolvimento visando solucionar o problema das áreas onde o diagnóstico por Kato-Katz não é eficiente. Uma dessas vertentes de inovação é a metabolômica que é uma abordagem holística analítica e já foi amplamente aplicada em estudos de patogênese das doenças (BRINDLE et al., 2002; YANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009a), toxicidade de drogas (WATERS et al., 2005; YAP et al., 2006) ciência ambiental (BUNDY et al., 2002; DING et al., 2009) e nutricional (HOLMES et al., 2006; REZZI et al., 2007).

#### **2.4 Metabolômica**

O metaboloma é o conjunto de pequenas moléculas (mensageiros das vias metabólicas) presentes em um organismo. A compreensão geral desses metabólitos presentes em um organismo pode ser elucidada de uma forma qualitativa ou quantitativa por meio de um estudo denominado metabolômica (HALL, 2006).

O termo metabolômica foi introduzido recentemente pelo grupo do Dr. Oliver Fiehn (FIEHN et al., 2000) e está cada vez mais difundido entre os usuários das plataformas “OMICS” (genômica, transcriptômica, proteômica). A metabolômica fornece resultados cruciais para o entendimento das informações biológicas relacionadas ao metaboloma.

Esta abordagem também tem sido aplicada com sucesso em estudos parasitológicos com caracterizações abrangentes das respostas metabólicas do hospedeiro a infecções por vários parasitas, como exemplo o *Trypanosoma brucei brucei* (WANG et al., 2008), *Plasmodium berghei* (LI et al., 2008) e *Echinostoma caproni* (SARIC et al., 2008, 2009). Trabalhos com modelos de esquistossomose já começaram a ser utilizados e foram identificadas diversas modificações em metabólitos (Piruvato, Triptofano, Creatinina, 2-Oxoglutarato) nos modelos animais com alta carga de infecção, que indicavam alterações da microbiota e defeitos metabólicos principalmente hepáticos (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008, 2010; LI et al., 2011; WANG et al., 2004).

Mesmo não existindo uma metodologia única para a metabolômica, diversos grupos de pesquisa estão constantemente melhorando a capacidade de separação e reconhecimento dos metabólitos nas diversas amostras biológicas que podem ser analisadas por essas ferramentas e estão conseguindo cada vez mais resultados

satisfatórios (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008; GARCÍA et al., 1998; VILLAS-BÔAS et al., 2007; WANG et al., 2004).

A técnica foi desenvolvida na década de 80 com o uso de espectrometria de massa por ionização branda (SIMS) (VAN DER GREEF, 1986), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (TANAKA; HINE, 1982) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (NICHOLSON; BUCKINGHAM; SADLER, 1983). Sendo assim a identificação e quantificação dos metabólitos necessita de plataformas com equipagem robusta, como espectrometria de massa (MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e fluorescência induzida por laser (LIF). O que vai definir qual técnica será utilizada é o objetivo do estudo, pois a NMR é muito seletiva, não destrutiva, mas possui baixa sensibilidade (LINDON; NICHOLSON, 2008); já o LIF é muito mais sensível, porém não apresenta seletividade química o que é muito importante no momento da determinação estrutural de um composto. A MS oferece uma boa combinação de seletividade e sensibilidade (LEI; HUHMAN; SUMNER, 2011).

A MS é uma técnica que detecta a razão massa sobre a carga ( $m/z$ ) de íons, os quais são provenientes de uma fonte de ionização. A fonte pode gerar íons na fase gasosa, a partir de moléculas neutras ou carregadas. Um grande avanço na MS foi o desenvolvimento de novas fontes de ionização, como *Electrospray Ionization* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI), que não possuem a necessidade de vácuo para gerar os íons, como no caso da ionização por elétron (EI) e a ionização química (CI) (ABDELNUR, 2011).

Devido as novas estratégias de ionização desenvolvidas para a MS surgiu a possibilidade de analisar uma ampla faixa de compostos químicos, desde pequenas moléculas polares até macromoléculas. Até então, só era possível fazer a análise de pequenos compostos, voláteis e estáveis à temperatura ambiente. Sendo também possível a incorporação da MS a sistemas de separação como colunas de cromatografia (VILLAS-BÔAS et al., 2007).

As técnicas de cromatografia e eletroforese capilar foram acopladas a MS para ampliar a resolução da técnica e para que fosse possível a avaliação de amostras quimicamente mais complexas nos estudos de metabolômica, quando comparados as análises diretas por MS (BEDAIR; SUMNER, 2008). As estratégias mais comuns para elevar a sensibilidade da técnica são as separações por “Gas Chromatography – Mass

Spectrometry” (GC-MS), “Liquid Chromatography – Mass Spectrometry” (LC-MS) e “Capillary electrophoresis – Mass Spectrometry” (CE-MS).

Os estudos de metabolômica são divididos em duas categorias: “Targeted” e “Untargeted”, ou “Non-Targeted” (DE VOS et al., 2007; DUDLEY et al., 2010; LIN et al., 2011). A primeira é uma forma direcionada para moléculas alvos, onde já são conhecidas, já a untargeted é feito um perfil (“profiling”) dos metabolitos totais presentes no espécimen analisado. A metabolômica pode ser quantitativa, mas essa forma de estudo é utilizada na categoria targeted, pois há a necessidade de se conhecer quais são seus alvos para se fazer uma curva de calibração do equipamento. Cada uma das estratégias tem sua importância e devem ser selecionadas com muita atenção a necessidade de cada experimento, para que não ocorram erros de análise ou interpretação.

As aplicações da metabolômica têm se expandido amplamente, assim como ocorreu com as técnicas de genômica, proteômica e transcriptômica nos últimos anos. A utilização dessas técnicas tem impulsionado a análise de vias metabólicas, elucidação de alvos para fármacos e busca de marcadores biológicos e vários outros estudos.

### 3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose continua em plena expansão (BARBOSA et al., 2015b) mesmo com as políticas públicas de controle (BARBOSA et al., 2016). Um dos grandes problemas é o diagnóstico dos indivíduos com baixa carga parasitária que muitas vezes não são identificados pela técnica de Kato-Katz, método diagnóstico padrão ouro para a doença (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Em inquéritos populacionais, a baixa adesão à coproscopia, por volta de 40% a 60% (BARBOSA et al., 2006, 2015a, 2015b; GOMES et al., 2014), se deve ao constrangimento das pessoas diante do odor específico na entrega do seu material fecal. A coleta de fluídos biológicos de fácil obtenção, como a urina, seria mais exitosa proporcionando maior adesão dos pacientes.

Esta pesquisa se justifica diante da demanda na saúde pública por um diagnóstico mais sensível, de rápida execução e fácil operacionalização, focando principalmente em áreas de baixa endemicidade e em indivíduos com baixas cargas parasitárias (JOHANSEN et al., 2010; PEELING; SMITH; BOSSUYT, 2010).

A busca destas informações é de extrema importância, pois a descoberta de biomarcadores auxilia no aprimoramento das ferramentas de diagnóstico e estadiamento da esquistossomose mansônica podendo resultar em novas e mais precisas ferramentas (kits) de diagnóstico, aperfeiçoando os resultados dos inquéritos epidemiológicos populacionais.



## 4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil metabólico na urina de murinos esquistossomóticos infectados com alta e baixa carga parasitária.

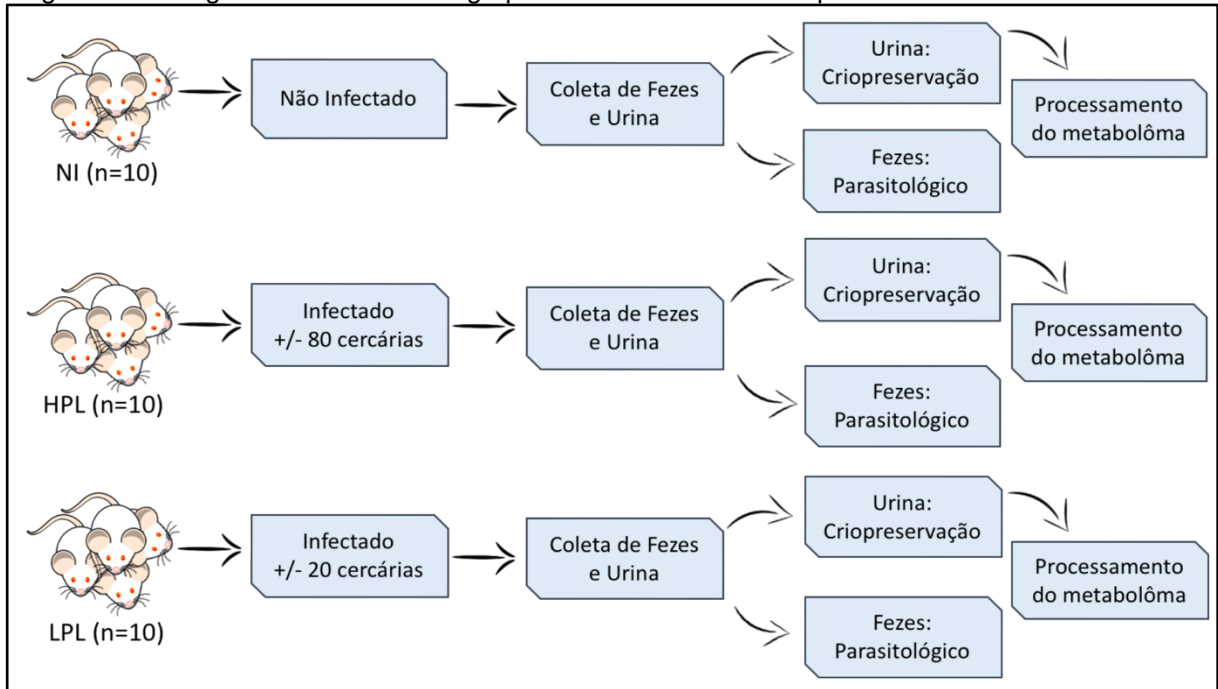
### 4.1 *Objetivos específicos*

- a) Quantificar a carga parasitária dos grupos de estudo;
- b) Identificar os metabólitos de interesse como potenciais marcadores biológicos da infecção pelo *S. mansoni*.

## 5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO

O estudo foi conduzido em três etapas: Infecção dos grupos de estudo, Coleta das amostras biológicas e análise do material coletado. As figuras 3 e 4 representam um organograma dessas etapas do estudo.

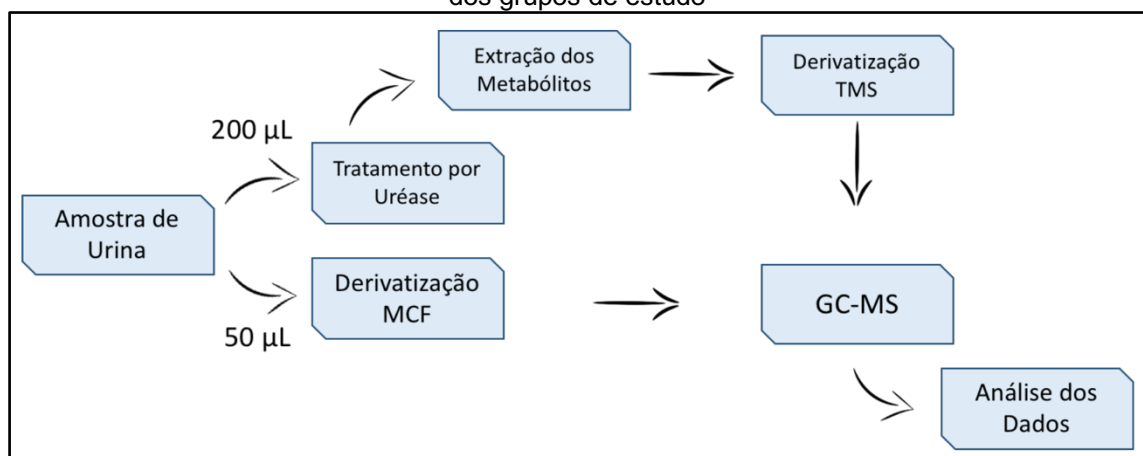
Figura 3 - Fluxograma da divisão dos grupos de estudo e fluxo dos procedimentos com as amostras



Fonte: O autor

Legenda: Demonstrativo da divisão dos grupos de estudo (NI: Não Infectados; HPL: Infectados com Alta carga Parasitária e LPL: Infectados com baixa carga parasitária) e fluxo de trabalho com as amostras.

Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos de metabolômica com as amostras de urina dos animais dos grupos de estudo



Fonte: O autor

Legenda: Demonstrativo da sequencia de procedimentos utilizados para realização da metabolômica com as amostras de urina dos animais infectados (HPL e LPL) e não infectados (NI).

## **6 METODOLOGIA PARA O OBJETIVO ESPECIFICO 1: QUANTIFICAR A CARGA PARASITÁRIA DOS GRUPOS DE ESTUDO**

### **6.1 Grupos de estudo**

O experimento utilizou 3 grupos de 10 camundongos *inbred* BALB/c (CHEEVER et al., 2002). Os grupos foram divididos em: Baixa Carga Parasitaria (LPL), Alta Carga Parasitaria (HPL) e Não-Infectados (NI). O número de animais para cada grupo foi definido com base em estudos que utilizaram grupos similares em suas experimentações e avaliaram a dose-resposta e a mortalidade (perda) dos animais, tendo em vista a manutenção estável da população em estudo com um número favorável para análises estatísticas (LIMA et al., 2015).

Os camundongos foram mantidos no biotério de experimentação animal do Instituto Aggeu Magalhães - IAM/Fiocruz em perfeitas condições de higienização, livre de contaminação e recebendo ração e água *ad libitum*.

### **6.2 Infecção dos grupos de estudo**

Para a infecção dos animais, foram utilizados furcocercárias da cepa LE, a qual foi isolada por J. Pellegrino em 1959 do paciente Luiz Evangelista que estava com infecção crônica por *Schistosoma mansoni* (ARAÚJO et al., 1986; VALADARES et al., 1981). Esta cepa é mantida rotineiramente há 30 anos no Laboratório e Serviço de Referência em Esquistossomose do IAM/Fiocruz em caramujos *Biomphalaria glabata* e camundongos da linhagem Swiss.

Em um copo tipo *Beaker* de 50 mL foram colocados 15 exemplares de *Biomphalaria glabata* previamente examinados e positivos para infecção por *S. mansoni*. Foi adicionado 30 mL de água (livre de cloro) ao frasco com os caramujos e estes foram expostos à luz incandescente por um período de 1 hora para estimular a liberação da forma infectante do parasito (cercária).

Após a exposição de 1 hora, foi coletado 1 mL da água para a contagem das cercárias conforme o cálculo:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} - \varphi \\ \beta \text{ mL} - \lambda \end{array}$$

Onde:  $\varphi$  é o número de cercárias encontradas em 1 mL da água dos caramujos infectados;  $\lambda$  é o número de cercárias a ser utilizado na infecção dos murinos e  $\beta$  é a alíquota a ser coletada da água para realizar a infecção nos murinos.

Os murinos do grupo LPL foram infectados percutaneamente com cerca de 20 cercárias por indivíduo e o grupo HPL com aproximadamente 80 cercárias por indivíduo. Esta dosagem, utilizada no grupo LPL, foi menor que as habitualmente utilizadas em pesquisas de alterações fisiopatológicas e imunológicas da parasitose (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008; WANG et al., 2004), foi adotada tendo em vista que os testes de metabólômica deste projeto foram pensados para representar áreas onde a população esteja com uma baixa carga parasitária.

Os murinos foram colocados em recipientes de vidro com tampa perfurada sendo adicionado 10 mL de água (livre de cloro) ao frasco mais a alíquota de cercárias normatizada pelo cálculo de cada grupo. Os animais foram expostos a essa infecção percutânea por um período de 1 hora em incidência direta de luz incandescente para estimular a penetração das cercárias.

Após o período de infecção os animais foram devolvidos a suas respectivas gaiolas e voltaram ao acondicionamento padronizado pelo Biotério de criação do IAM/Fiocruz.

### **6.3 Coleta das amostras biológicas**

#### 6.3.1 Urina

Após 47 dias da infecção, os murinos foram colocados individualmente em gaiolas pequenas (30x20x13cm), previamente esterilizadas, até que urinassem de forma espontânea. A urina foi aspirada utilizando micropipetador (KURIEN; EVERDS; SCOFIELD, 2004). A urina coletada de forma individual de todos os murinos no período de 08h às 11h da manhã, para se evitar a variação circadiana dos metabolitos (LI et al., 2011), foi colocada em tubo criogênico diretamente em banho gelado (gelo seco + álcool etílico PA) e posteriormente armazenadas em -80°C no Deep Freezer do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães. Todos os grupos

seguiram esse mesmo padrão e para evitar a contaminação da urina com as fezes, as mesmas eram recolhidas (vide idem 5.3.2.) e feita uma nova assepsia na gaiola.

### 6.3.2 Fezes

As amostras de fezes foram coletadas simultaneamente com a coleta da urina (LI et al., 2011). Cada *pellet* de fezes foi coletado imediatamente com pinça Adson sem dente e armazenadas em placas de Petri devidamente identificadas com o número do murino correspondente e a qual grupo pertencia, e foram encaminhadas para o exame parasitológico.

## 6.4 Análise parasitológica

Para a avaliação parasitológica dos grupos de estudo foi utilizado o kit HELM TESTE fabricado pela Bio-Maguinhos ([www.bio.fiocruz.br](http://www.bio.fiocruz.br)). As amostras foram processadas seguindo indicações do fabricante. As lâminas foram feitas com *spot* único e depois de 24 horas de secagem em temperatura ambiente foram levadas ao microscópio de campo claro da marca Nikon modelo eclipse E200 para visualização e contagem dos ovos de *S. mansoni*. Cada *spot* foi analisado por varredura de toda a área da amostra.

Os resultados dos exames parasitológicos foram expressos em Ovos por Grama de Fezes (OPG) que consiste na multiplicação do número de ovos visualizados na lâmina por um fator de conversão (24) indicado pelo fabricante. A verificação da diferença das cargas parasitárias entre os grupos de estudo foi realizada no software GraphPad Prism 6 utilizando o teste 2-way ANOVO com múltiplo teste de Bonferroni.

## 6.5 Confirmação da infecção

Para confirmação da infecção do animal que se apresentou negativo na análise parasitológica, foi realizado o procedimento de perfusão para captura de vermes adultos (DUVALL; DEWITT, 1967). A técnica consiste em perfundir o fígado do animal com uma solução salina 0.15 M (0,9%) por meio dos vasos do sistema porta hepático

(local que reside os vermes adultos do *Schistosoma*) e captura por varredura nos vasos do plexo mesentérico (local de oviposição dos casais de verme).

## **7 METODOLOGIA PARA O OBJETIVO ESPECIFICO 2: IDENTIFICAR O METABÓLITOS DE INTERESSE COMO POTENCIAIS MARCADORES BIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO S. MANSONI**

### **7.1 Determinação do metaboloma**

As amostras de urina foram enviadas (seguindo os padrões internacionais de envio de material biológico) para o *Mass Spectrometry Equipment Centre* na Universidade de Auckland e foram trabalhadas em parceria com o Prof. Dr. Augusto Simoes-Barbosa, Prof. Dr. Silas Villas-Boas. Todo o suporte para treinamento e manuseio dos maquinários foi dado pelas técnicas da plataforma de espectrometria de massa da Universidade de Auckland, a Dra. Erica Zarate e Saras Green.

#### 7.1.1 Preparação das amostras

As amostras passaram pelo processo de derivatização que consiste na transformação de uma substancia não volátil em um derivado volátil de estrutura semelhante. As propriedades (solubilidade, ponto de ebulição, ponto de fusão e o estado de agregação) resultantes dessa metodologia auxiliam os processos de quantificação e separação.

Nesse estudo foram utilizados dois processos de derivatização. O procedimento por Cloroformato de metilo (MCF) metodologia a qual foca na análise de ácidos orgânicos e também o protocolo utilizando o Trimetilsililo (TMS) que é uma técnica focada na detecção de açúcares. Para cada tratamento, 2,3,3,3-d4-alanina (d4-Alanina) foi adicionada na concentração de 10 mM em cada amostra. A d4-Alanina foi usada como um padrão interno permitindo comparar a abundância relativa de cada metabólito entre as amostras.

Para realização do MCF foi utilizado 50 µL de urina. A mistura da urina (50 µL) com o padrão interno (20 µL) foi transferida para tubos de ensaio silanizados e foram adicionadas 400 µL de hidróxido de sódio (1M), 334 µL de metanol e 68 µL de piridina. As amostras então foram colocadas em agitação e foram adicionados 40 µL de MCF, após 30 segundos mais 40 µL de MCF foram adicionados e se esperou mais 30 segundos para se adicionar 400 µL de clorofórmio, após 10 segundos foi adicionada

a mistura 800 µL de bicarbonato de sódio, 10 segundos após sua adição, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos usando 2500 RPM em uma temperatura de 6 °C. Observou-se a formação de duas camadas, onde a camada superior foi removida e foram adicionadas 2 gramas de sulfato de sódio nas amostras para remoção de resíduos de água. A fase líquida de cada amostra resultante do final de todo esse procedimento foi transferida para um frasco específico para realização da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e foram encaminhadas para análise no Agilent Technologies 5975C inert MSD (SMART et al., 2010).

Para realização do TMS as amostras foram submetidas a um pré-tratamento prévio com uréase visando remover o excesso de ureia das amostras o que prejudicaria a análise dos outros componentes na amostra (CHAN; PASIKANTI; NICHOLSON, 2011). Após misturar a urina (200 µL) com a padrão interno (20 µL) a uréase foi adicionada na concentração de 100 U. O tratamento com uréase foi feito à 37 °C por 60 minutos (MATSUMOTO; KUHARA, 1996; PASIKANTI; HO; CHAN, 2008).

Após o pré-tratamento foi realizado o procedimento de extração dos metabólitos onde foram adicionados 500 µL de metanol à 50% (em banho gelado com temperatura aproximada de -78 °C), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos à -9 °C usando 3500 RPM. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 500 µL de metanol à 80% no tubo com o pellet para ser resuspendido em vortex e centrifugado à -9 °C por 5 minutos usando 3500 RPM. O sobrenadante foi transferido para o tubo do primeiro sobrenadante e a solução com aproximadamente 1 mL foi incubada por 40 minutos à -80°C.

Após o congelamento as amostras foram colocadas no SpeedVac™ para secar durante 4 horas, sem aquecimento e utilizando um *ramp* de 3 (procedimento otimizado para soluções alcoólicas). Após as 4 horas no equipamento, as amostras foram colocadas no dessecador (na presença de pentóxido de fósforo com o proposito de reter a humidade) por um período de 12-24h. Após esse período, foi certificado de que as mostras estavam completamente desidratadas para começar a derivatização.

As amostras foram resuspendidas em 80 µL de uma solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (2 g/ 100 mL) e transferidas para frascos silanizados específicos para realização da GC-MS e incubados por 90 minutos à 30 °C. Em



seguida foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos à 37 °C quando então as amostras foram encaminhadas para análise no equipamento Agilent Technologies 5975C inert MSD.

## 7.2 Análise dos dados gerados

Os dados gerados pelo equipamento de GC-MS foram analisados utilizando os softwares: **Agilent ChemStation**<sup>1</sup>, Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System - **AMDIS**<sup>2</sup>, o software **R**<sup>3</sup> e toda a informação de saída foi tabulada no Microsoft **Excel**<sup>4</sup> 2016 para tratamento e realização das análises estatísticas, sendo utilizada a metodologia descrita por SMART et al., 2010.

O software **GraphPad Prism 6**<sup>5</sup> foi utilizado para a realização das seguintes análises estatísticas: 2-Way ANOVA associado ao teste de Bonferroni para múltipla comparação, coeficiente de correlação produto-momento -correlação de Pearson- e regressão linear.

---

<sup>1</sup> Disponível em: <http://www.agilent.com/en-us/support/software-informatics/multiinstrumentsoftwarerev>

<sup>2</sup> Disponível em: <http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>

<sup>3</sup> Disponível em: <https://www.r-project.org/>

<sup>4</sup> Disponível em: <https://products.office.com/en-us/excel>

<sup>5</sup> Disponível em: <https://www.graphpad.com/>

## 8 HIPÓTESE DO ESTUDO

A infecção por baixa carga parasitária do *S. mansoni* pode ser identificada por meio de metabólitos na urina (biomarcadores).

## **9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este trabalho foi submetido para avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães. Foi aprovado (anexo A) sob número de processo 94/2016.

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Objetivo específico 1: Quantificar a carga parasitária dos grupos de estudo

O resultado do exame parasitológico, 47 dias depois da infecção, foi avaliado em OPG e pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 - Demonstrativo da carga parasitária em OPG de cada animal dos grupos de estudo.

GRUPOS	IDENTIFICAÇÃO DOS CAMUNDONGOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HPL	1512	360	1392	1176	408	1896	1248	1224	672	984
LPL	0	0	0	24	48	0	24	0	0	0
NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: O autor

Nota: valores de 0 até 99 são considerados baixa carga parasitária; 100 a 500 intensidade moderada; maior que 500 é considerado infecção elevada.

Legenda: HPL= Alta Carga Parasitaria; LPL= Baixa Carga Parasitaria; NI= Não-Infectados

Os animais do grupo LPL estão no limiar de erro de detecção do método de Kato-Katz, sendo bastante comum diagnóstico com falso-negativo.

Para verificação da positividade de todos os animais desse grupo foi feita uma repetição do exame Kato-Katz nos animais que se apresentaram negativos. As amostras foram coletadas com 60, 65, 70 e 75 dias pós-infecção os resultados estão demonstrados na Tabela 2 em OPG.

Tabela 2 - Repetição do exame parasitológico nos animais negativos do grupo de baixa carga parasitária (LPL) para confirmação da infecção.

PÓS-INFECÇÃO	ANIMAIS (GRUPO LPL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60° DIA	0	312	0	*	*	0	*	0	0	48
65° DIA	24	*	168	*	*	0	*	0	0	*
70° DIA	*	*	*	*	*	0	*	24	24	*
75° DIA	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*

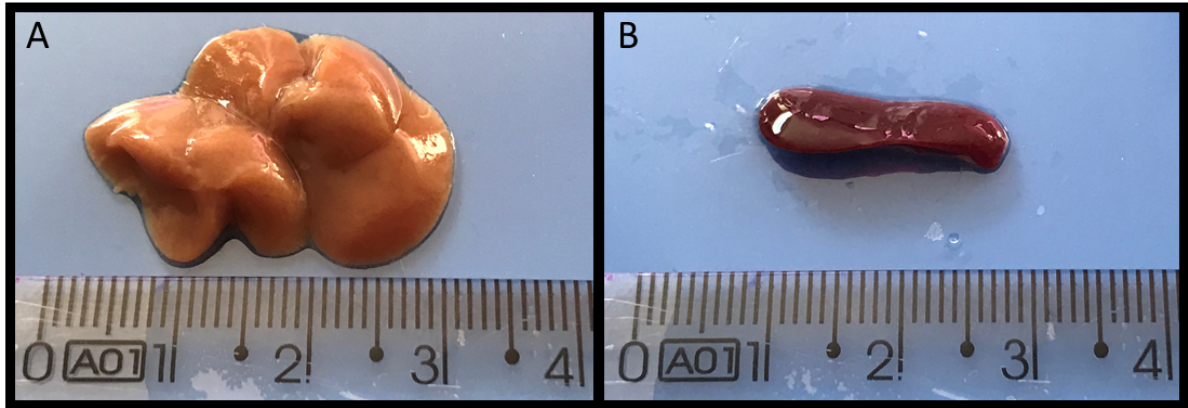
Fonte: O autor

Nota: \* não foi realizado o exame pois os animais já se mostraram positivos para o teste

O animal de número 6 do grupo LPL não apresentou ovos no exame parasitológico em nenhuma das amostras coletadas. Sendo assim, o animal foi encaminhado para eutanásia e realizado o procedimento de perfusão hepática, entretanto não foram visualizados vermes adultos no sistema porta hepático e nem no plexo mesentérico. Os principais órgãos comprometidos em uma infecção por

*Schistosoma mansoni* (fígado e baço) não apresentaram anomalias morfológicas características de um animal infectado (Figura 5).

Figura 5 - Visualização dos aspectos macroscópicos de órgãos do animal de número 6 do grupo de baixa carga parasitária (LPL)



Fonte: O Autor

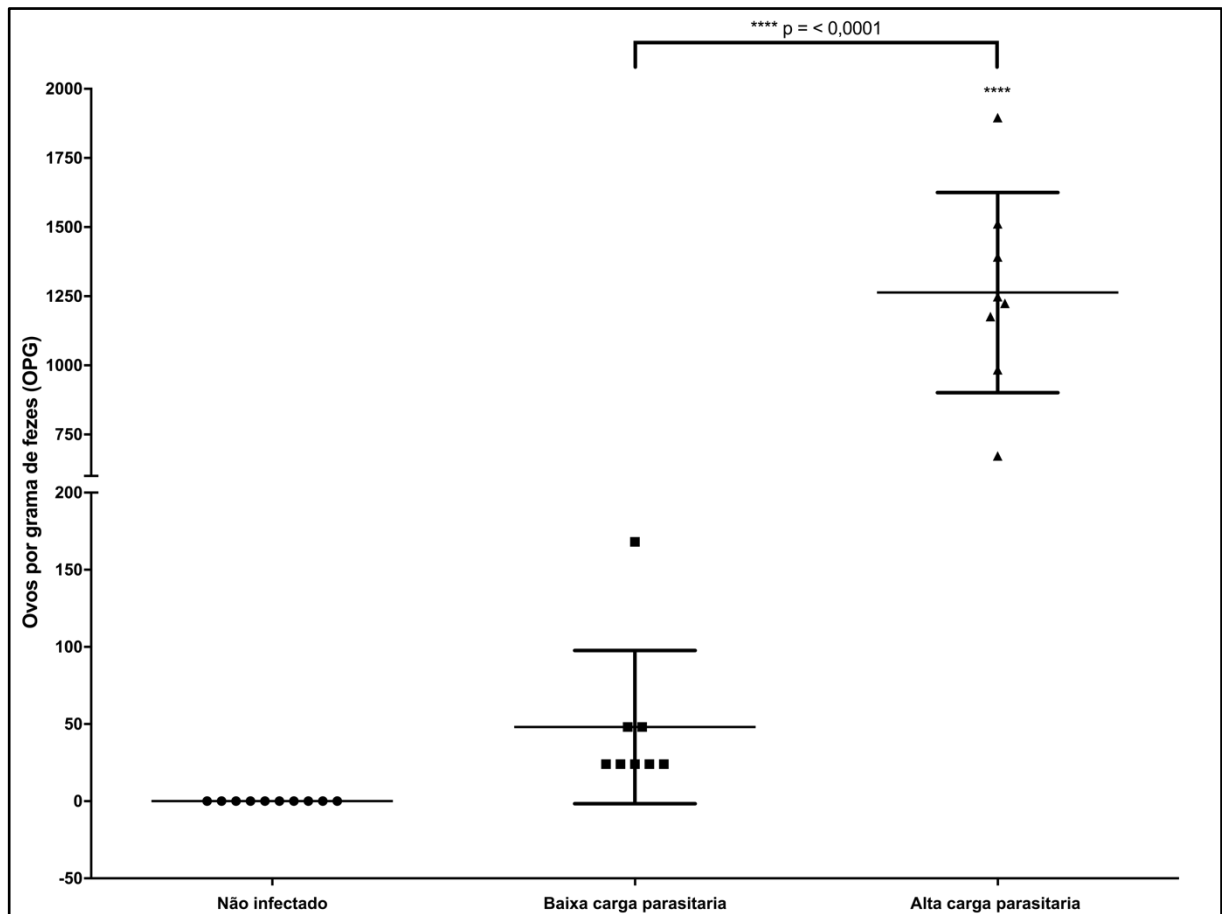
Nota: Os órgãos não mostram sinais patológicos como por exemplo áreas granulomatosas. O que ratifica a ausência da infecção, sendo assim considerado um animal não infectado.

Legenda: (A) fígado e (B) baço

O animal de número 6 do grupo LPL não se infectou e por esse motivo não entra no critério estabelecido para o seu grupo, sendo assim, sua amostra de urina foi retirada do estudo.

Os resultados de positividade dos animais do grupo LPL foram compilados e comparados com os outros grupos para se ter uma avaliação da diferença entre as cargas parasitárias (Figura 6).

Figura 6 – Comparação da carga parasitológica de *S. mansoni* dos grupos NI, LPL e HPL.



Fonte: O Autor

Legenda: Avaliação da diferença estatística entre as infecções dos grupos de estudo. É demonstrando a ausência de diferença entre os grupos Não Infectado (NI) e Baixa Carga Parasitária (LPL) e uma grande diferença desses grupos com o Alta Carga Parasitária (HPL).

O grupo LPL não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo NI o que retrata a baixa carga parasitária pretendida nessa experimentação e o grupo HPL se mostrou estatisticamente bem diferente de todos os grupos. Esse resultado demonstra que a metodologia de infecção utilizada nesse estudo foi satisfatória para o seu desenho.

## 10.2 Objetivo específico 2: Identificar metabólitos de interesse como potenciais marcadores biológicos da infecção por *S. mansoni*

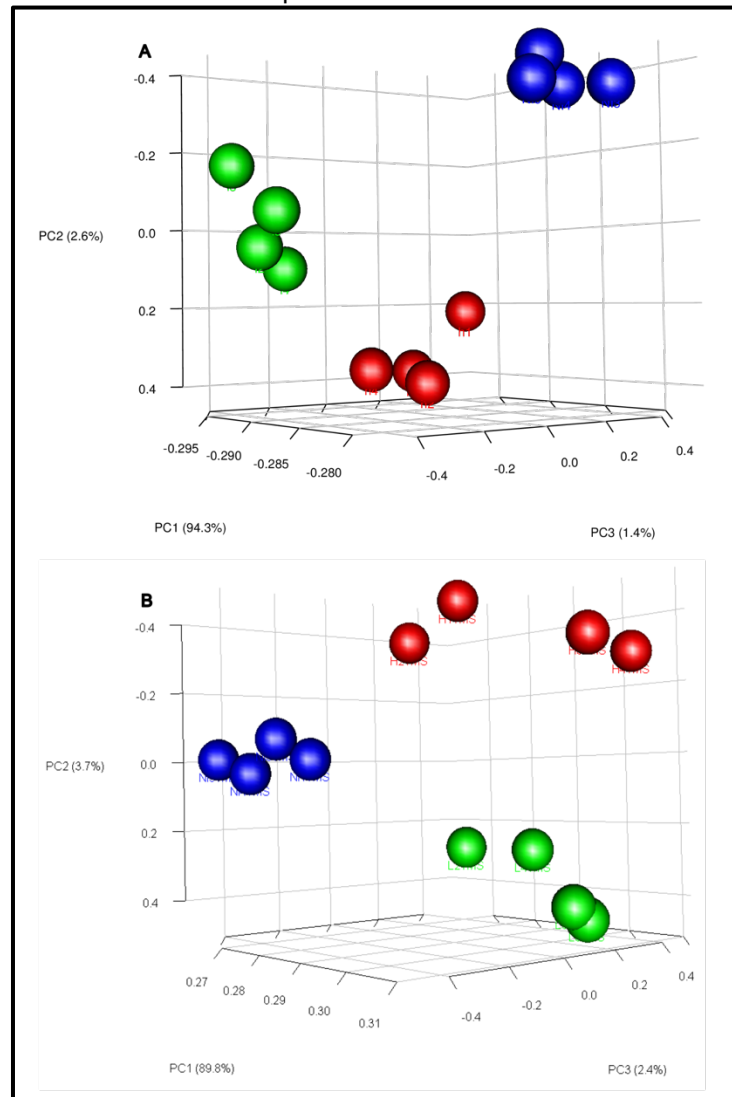
Devido ao volume de urina necessário para realização das duas técnicas de derivatização (MCF e TMS), as amostras de urina dos animais foram combinadas em um *pool* de dois indivíduos, sendo os grupos iniciais de 10 animais, os grupos finais

para metabolômica ficaram com 5 combinados. Essa combinação das amostras não foi prejudicial para a análise do estudo, pois todos os animais eram geneticamente idênticos, do mesmo sexo e estavam sendo mantidos em mesma condição de alimentação e ambientação.

Foi realizada, utilizando o software R, a análise de componentes principais (PCA) levando em conta os valores de abundância relativa dos metabólitos identificados na GC-MS. Essa análise consiste na transformação ortogonal dos dados num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas chamadas de componentes principais. O componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados. Essa forma representativa dos dados facilita a visualização de padrões aonde as amostras são agrupadas de acordo com suas similaridades. A distância entre cada amostra ou grupo é decorrente de suas dissimilaridades. Neste estudo, as (dis)similaridades são reflexo da presença e abundancia relativa dos metabolitos em cada amostra ou grupo.

Nesta análise, as amostras de cada grupo foram propositalmente coloridas com intuito de facilitar a visualização gráfica: vermelha, verde e azul para HLP, LPL e NI, respectivamente (Figura 7). De imediato é possível visualizar a formação de grupos (HPL, LPL e NI) aonde as amostras de cada cor formam grupos distintos (Figura 7). Ou seja, as amostras dentro um grupo estão mais próximas entre si do que as amostras de grupos diferentes. Esse resultado indica que a urina obtida dos animais infectados com alta e baixa carga parasitaria contem metabolitos especificos que permitem diferenciar os três tratamentos: HLP, LPL e NI.

Figura 7 - Visualização da análise por PCA nas amostras de urina derivatizadas e processadas por GC-MS.



Fonte: O autor

Legenda: Derivatizado por MCF (A) e TMS (B). O grupo HPL está representado pela cor vermelha, o LPL pela cor verde e o NI pela cor azul.

Os grupos formados nas amostras oriundas do MCF são bem determinados. Há a ocorrência de uma distribuição não homogênea no grupo HPL oriundo do TMS, mas mesmo assim é possível a visualização de grupos distintos.

Para identificar metabólitos específicos de cada tratamento, foi feita uma análise minuciosa de todos os possíveis metabólitos identificados pelo GC-MS. O resultado bruto da GC-MS derivatizado por MCF gerou uma planilha com 172 metabólitos e após verificação de duplicatas ou possíveis contaminações, o método foi passível de fazer a identificação de 81 metabólitos (Tabela 3).



Tabela 3 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por MCF e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabólito encontrado e a biblioteca analisada).

(continua)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
Oxalic acid	59	6,13	90
Butanoic acid	59	6,36	52
2-Oxovaleric acid	71	6,423	95
Pyruvic acid	89	7,44	81
Malonic acid	101	7,528	99
oxopentanoic acid	57	7,947	93
Nicotinamide	57	8,097	89
Fumaric acid	113	8,721	91
Levulinic acid	99	8,806	78
Succinic acid	115	9,16	90
2-Hydroxyisobutyric acid	73	9,235	90
Fumaric acid	113	9,292	91
Lactic acid	103	9,31	98
Butanedioic acid	129	9,54	91
Benzoic acid	105	9,734	98
Itaconic acid	127	10,056	82
2-Hydroxyisobutyric acid	73	10,52	90
Citramalic acid	117	10,793	82
Glutaric acid	100	10,824	96
NADP_NADPH	138	10,921	97
Alanine	102	11,189	90
Glyoxylic acid	75	11,298	75
Malic acid	103	11,435	84
Glycine	88	11,546	96
Adipic acid	114	12,48	96
Glyceric acid	119	12,802	80
beta-Alanine	88	12,822	99
Valine	130	12,884	97
methylpropionic acid	85	13,081	66
Aminocyclopropane acid	141	13,554	64
Pimelic acid	115	13,928	97
2-Oxoglutaric acid	115	14,134	92
Norleucine or Leucine	144	14,164	84
2-Hydroxyglutaramic acid	85	14,419	94
2-Oxoadipic acid	129	14,593	92
2-Phosphoenolpyruvic acid	109	14,658	68
4-Aminobutyric acid	102	14,961	84
Proline	128	15,139	89
Suberic acid	129	15,303	92
cis-Aconitic acid	153	15,64	92
Threonine	115	15,762	78

Tabela 3 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por MCF e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabólito encontrado e a biblioteca analisada).

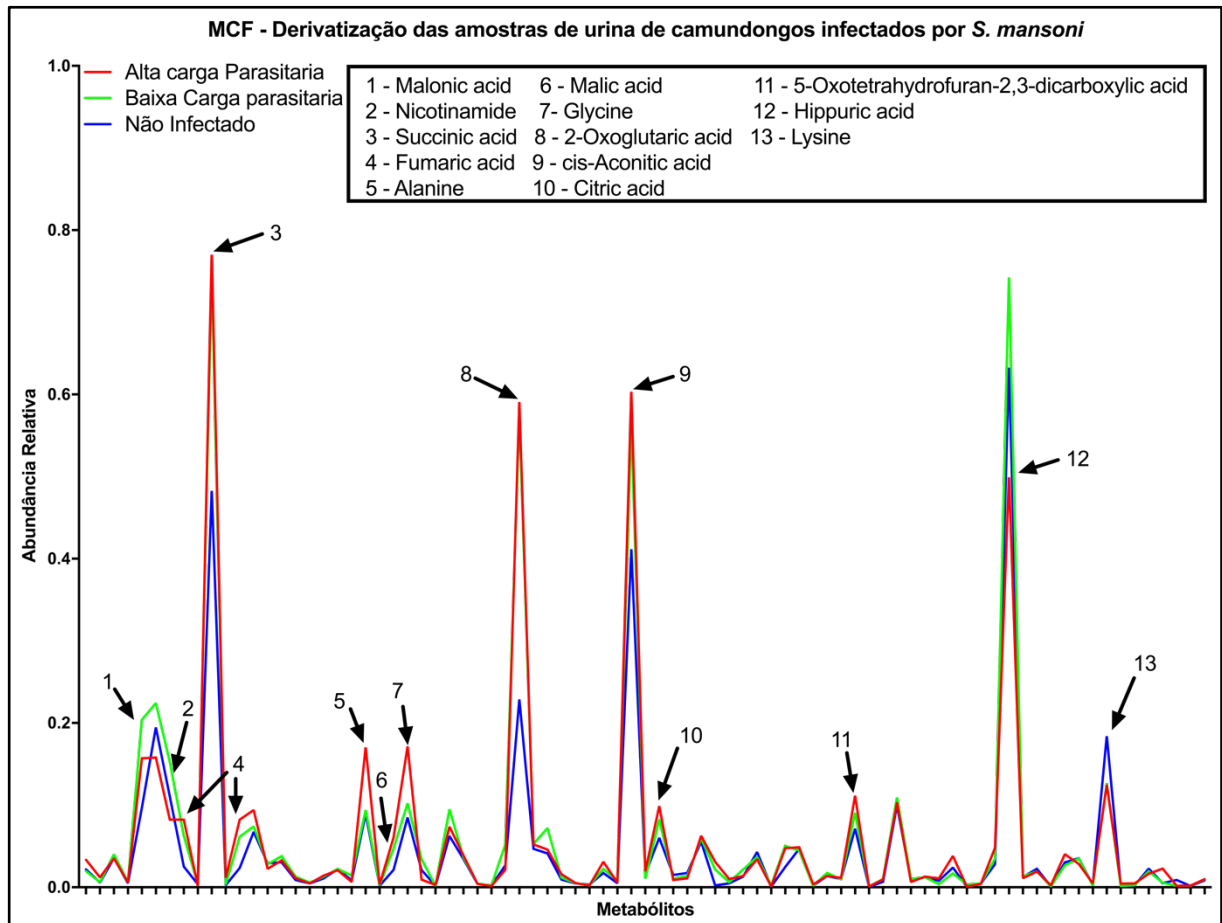
(conclusão)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
Citric acid	101	16,106	82
2,4-Di-tert-butylphenol	191	16,519	93
Aspartic acid	160	16,523	72
Pyroglutamic acid	84	16,595	81
Azelaic acid	185	16,599	84
2-ketoglutarate	114	16,623	81
Hydroxyglutaramic acid	71	16,68	88
Asparagine	127	16,692	91
Salicylic acid	135	16,939	60
O-Acetylmalic anhydride	131	17,222	49
Hydroxybenzoic acid	135	17,292	86
Serine	100	17,513	64
Glutamic acid	174	18,277	96
Methionine	147	18,362	84
3-dicarboxylic acid	143	18,426	83
Aminophenylacetic acid	164	18,633	68
Glutathione	142	19,062	58
4-Hydroxyphenylacetic acid	121	19,175	97
N-Acetylglutamic acid	116	19,378	96
Phenylalanine	162	20,137	96
2-Aminoadipic acid	114	20,215	93
Cysteine	192	20,299	96
Tartaric acid	59	20,89	53
Vanillic acid	165	21,165	94
Isocitric acid (	129	21,194	80
Hippuric acid	105	21,765	98
Putrescine	88	21,977	88
Coumaric acid	161	23,294	90
Linoleic acid	67	24,174	73
Syringic acid	211	24,487	95
Ornithine	128	24,942	87
Glutamine	84	25,073	81
Lysine	142	26,492	89
Arachidonic acid	79	26,641	85
Histidine	139	27,385	81
Tyrosine (split peak 2)	236	28,843	80
DHA	79	29,811	80
2,6-Diaminopimelic acid	200	29,876	74
Sinapic acid	296	29,996	90
Tryptophan	130	33,647	91

Fonte: O Autor

Para identificar metabólitos que apresentaram uma diferença quantitativa significativa entre os grupos usando o método de MCF, o teste de Bonferroni (com um valor de 'p' menor que 0,05) foi aplicado. Como exemplo, a Figura 8 ilustra o resultado de quantificação relativa dos metabólitos entre os grupos de estudo.

Figura 8 - Identificação dos metabólitos com diferença significativa entre os grupos de estudo.



Fonte: O Autor

Legenda: Os metabólitos dessa análise foram derivatizados por MCF. HPL: Alta carga Parasitaria, LPL: Baixa Carga Parasitaria e NI: Não Infectados.

Da mesma forma que o MCF, foi feito uma análise minuciosa dos dados brutos da GC-MS derivatizado por TMS que gerou uma planilha com 381 metabólitos e após verificação de duplicatas ou possíveis contaminações, foi possível com esse método a identificação de 157 metabólitos (Tabela 4).

Tabela 4 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por TMS e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabólito encontrado e a biblioteca analisada).

(Continua)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
Disiloxanamine, 1,1,3,3,3-pentamethyl-N-(trimethylsilyl)-	73	4.682	85
Ethylene glycol (split peak 1)	147	5.02	76
Oxalic acid (split peak 1)	73	5.021	74
Propylene glycol (split peak 1)	117	5.217	75
Tetrasiloxane	207	6.103	90
MSTFA	77	6.686	82
Mono-pent-4-enyl phthalate	221	6.854	73
2-Hydroxybutyric acid (split peak 1)	131	7.11	84
Lactic acid (split peak 1)	147	7.468	89
2-(methoxyimino)-propanoate	73	7.519	75
Propanedioic acid (split peak 1)	147	7.995	84
Glycolic acid (split peak 1)	147	8.055	81
Lactic acid (split peak 2)	147	8.203	82
L-Alanine	116	8.213	87
Glycolic acid	73	8.371	93
Pentasiloxane	281	8.514	97
1-(3-Methylbutyl)-2,3,4,6-tetramethylbenzene	147	8.557	83
Glycine (Incomplete)	102	8.741	88
2-Hydroxybutyric acid (split peak 2)	131	8.751	84
3-Methyl-2-ketobutyric acid (split peak 1)	73	8.805	90
Dimethyl sulfone	79	8.965	98
3-Methyl-2-ketobutyric acid (split peak 2)	73	9.154	90
Hydracrylic acid	147	9.226	94
3-Hydroxybutyric acid	147	9.36	91
Propanoic acid (split peak 1)	147	9.426	82
Oxalate	73	9.658	61
Tris(trimethylsilyl)carbamate	147	9.84	89
Lactic acid (split peak 4)	147	9.851	89
Silane (split peak 3)	73	9.978	83
2-Keto-3-methylvaleric acid (split peak 1)	73	10.039	89
3-Methyl-4-trimethylsiloxy(trimethylsilyl)butyrate	147	10.131	74
L-Valine	144	10.221	93
2-Keto-3-methylvaleric acid (	73	10.262	89
2-Keto-3-methylvaleric acid (	73	10.495	89
Ethanolamine (split peak 1)	174	10.547	79
Butanedioic acid (split peak 1)	147	10.576	83
Butanedioic acid (split peak 2)	147	10.864	83
1,2,3-Butanetriol	73	11.078	92
L-Leucine (split peak 1)	158	11.157	90

Tabela 4 -Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por TMS e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabolito encontrado e a biblioteca analisada).

(Continuação)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
Pipecolic acid	156	11.215	81
l-Norvaline (split peak 2)	174	11.233	85
Benzoic Acid	179	11.333	85
L-Leucine (split peak 2)	158	11.399	90
L-Leucine (split peak 3)	158	11.468	90
Glycine	174	11.555	92
Hexanoic acid	73	11.722	93
Methylsuccinic acid (split peak 1)	147	11.812	85
Catechol	73	11.909	94
5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-2-ylamine	292	12.219	77
(R,S)-2,3-Dihydroxybutanoic acid	73	12.297	76
Butanedioic acid (split peak 3)	147	12.422	83
Methylsuccinic acid (split peak 2)	147	12.493	85
5-Hydroxyhexanoic acid	117	12.555	87
2-Butenedioic acid	245	12.812	87
Pentanoic acid	147	12.89	76
Methylmaleic acid	73	13.043	81
Urea	147	13.267	95
Butanoic acid	103	13.305	85
Alanine (split peak 2)	174	13.377	75
(R,S)-3,4-DIHYDROXYBUTANOIC ACID	73	13.549	96
l-Leucine	186	13.633	88
Pentanedioic acid	147	13.682	90
3-Aminoisobutyric acid (split peak 4)	174	13.716	82
Aceturic acid	73	13.818	76
1-Deoxypentitol (split peak 1)	73	14.018	78
.alpha.-Lyxopyranose (split peak 1)	204	14.053	75
Parabanic acid	100	14.109	77
Erythrono-1,4-lactone	73	14.134	87
3,7-dihydroxyheptanoic acid	73	14.191	85
MESO-ERYTHRITOL (split peak 2)	73	14.281	83
Aminomalonic acid	73	14.498	79
Alloxanic acid	73	14.569	71
Malic acid	73	14.614	96
4-Aminobutanoic acid	174	14.7	80
2,3,4-Trihydroxybutyric acid	73	14.834	95
Hexanedioic acid	73	14.974	94
3,7-dihydroxyheptanoic acid (	73	15.04	85
Xylose (split peak 2)	73	15.16	71
Creatinine	73	15.332	75
Pentitol	73	15.514	93

Tabela 4 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por TMS e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabólito encontrado e a biblioteca analisada).

(Continuação)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
Silane	231	15.514	67
Glycine	73	15.571	86
5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	73	15.646	80
Pentanedioic acid	73	15.68	85
Hexanedioic acid (split peak 1)	73	15.802	83
5-Aminovaleric acid	174	15.847	82
Xylose (split peak 2)	73	15.999	76
RIBOSE (split peak 5)	73	16.15	77
Phenylalanine	73	16.271	77
Tartaric acid	73	16.308	83
RIBITOL (split peak 2)	73	16.494	81
4-Hydroxybenzeneacetic acid	73	16.572	79
Fucose	117	16.904	84
Hexanedioic acid	73	16.972	84
Gulonic acid (split peak 1)	73	17.217	79
Ribonic acid	73	17.669	89
Tagatopyranose (split peak 1)	73	17.769	81
1,5-Dioxa-2,4,6,8-tetrasilacyclooctane	277	17.902	73
Orotic Acid	254	17.928	82
Fructofuranose	73	17.948	90
Sorbopyranose (split peak 3)	204	18.335	81
Aconitic acid	73	18.36	93
Phosphoric acid	73	18.816	91
5-Androsten-3.beta.-ol-7	73	18.852	76
Galactofuranose (split peak 1)	217	18.974	70
4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol	297	19.084	85
Pentaric acid (split peak 1)	73	19.197	82
Citric acid	273	19.231	89
Methyl galactoside (split peak 3)	73	19.3	78
MANNOSE (split peak 4)	73	19.437	85
Citric acid (split peak 2)	273	19.564	89
MANNITOL (split peak 2)	319	19.686	81
GLUCOSE (split peak 6)	73	19.891	85
Succinylacetone	257	20.219	75
INOSITOL (split peak 1)	318	20.285	94
3,5-Dioxa-4-phospha-2-silaoctan-8-oic acid	73	20.406	81
L-Lysine	73	20.432	84
Glucaric acid (split peak 1)	333	20.693	90
Gluconic acid	73	20.811	93

Tabela 4 - Metabólitos encontrados no procedimento de derivatização por TMS e suas principais características (íon característico, tempo de retenção e porcentagem de semelhança entre o metabólito encontrado e a biblioteca analisada).

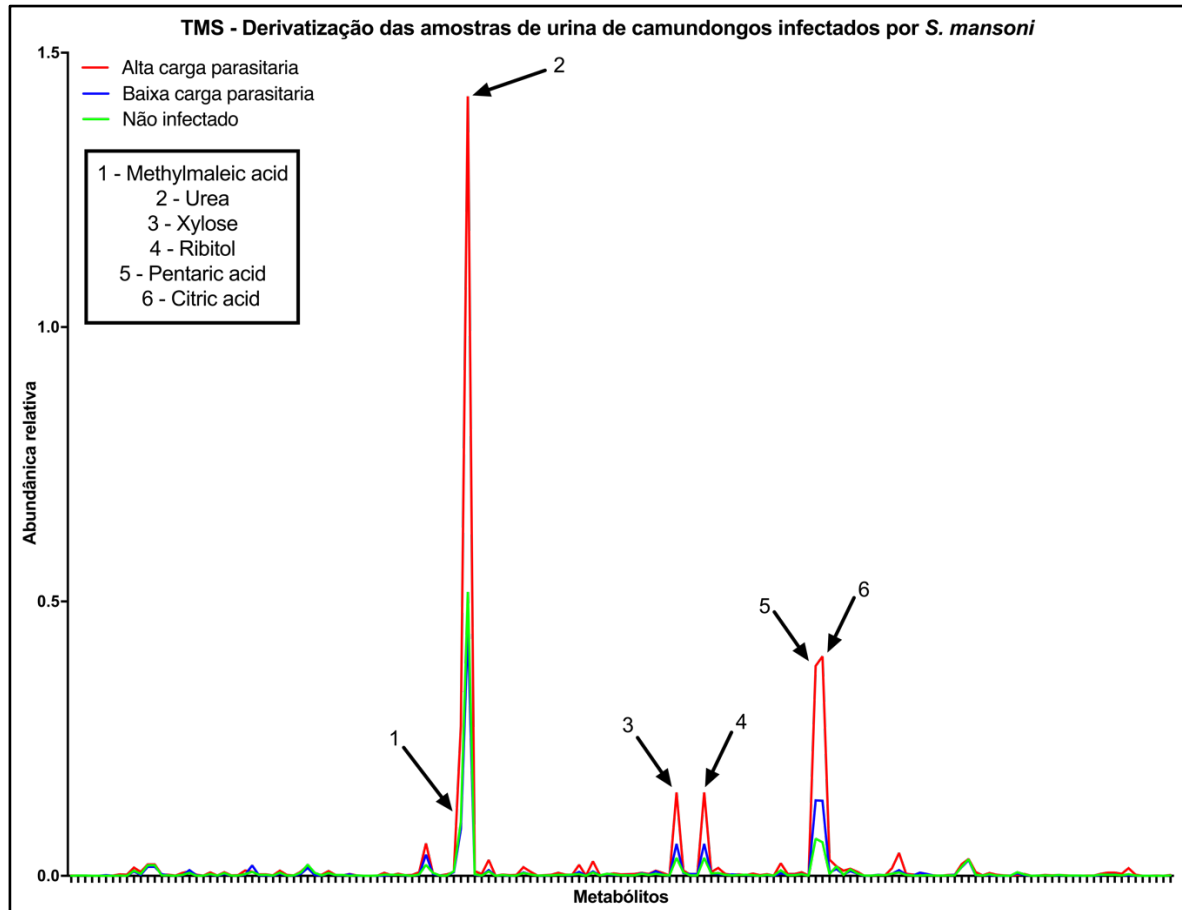
(Conclusão)

<i>Nome</i>	<i>Íon de referência</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Porcentagem de correspondência</i>
4-Hydroxyphenyllactic acid	73	20.907	80
Glucaric acid (split peak 2)	333	21.049	90
Galactonic acid	73	21.227	88
alpha.-Arabinopyranose	217	21.342	71
Syringic acid	327	21.528	91
L-Tyrosine	218	21.604	80
Palmitic Acid	117	22.418	96
Gluonic acid (split peak 2)	73	22.525	80
Ascorbic acid	73	22.632	95
Hippuric acid	105	22.643	95
INOSITOL (split peak 2)	305	22.935	95
Mannonic acid	73	22.999	84
Pantothenic acid	73	23.222	96
MANNITOL (split peak 3)	319	23.273	81
SORBITOL (split peak 3)	319	23.383	81
Ethyl-3-oximinogon	358	23.603	72
Uric acid	73	24.12	88
Allopyranose (split peak 2)	204	24.314	85
Kynurenic Acid	318	24.54	91
Ferulic acid	338	24.563	94
9-Octadecenoic acid	73	24.835	87
Stearic acid	117	25.068	93
D-Galactofuranoside	73	25.086	72
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	173	25.094	82
.alpha.-Acetyl-L-Lysine	174	25.569	84
Xanthurenic acid	406	26.844	79
5-Hydroxyindoleacetic acid	218	28.224	88
Trimethylsilyloxy(trimethylsilyl)hippurate	73	28.432	83
SUCROSE (split peak 1)	361	31.407	94
Fucopyranose (split peak 6)	204	31.799	80
Glucose (split peak 3)	204	31.803	85
Ribofuranose	217	32.498	79
LACTOSE (split peak 1)	204	32.649	86
LACTOSE (split peak 3)	204	33.031	86
MALTOSE (split peak 4)	361	33.47	80
Silane	408	41.92	80
2,4-Dibenzyl-5,8-dimethoxy-6-methyl-1-naphthol	398	42.659	79
RAFFINOSE (split peak 2)	361	47.088	95

Fonte: O Autor

Como exemplo, a Figura 9 demonstra a abundância relativa dos metabólitos encontrados no TMS destacando os metabólitos que apresentaram diferença significativa para o teste de Bonferroni com um valor de 'p' menor que 0,05.

Figura 9 - Cromatograma de massa evidenciando os metabólitos com diferença significativa.



Fonte: O autor

Legenda: Os metabólitos dessa análise foram derivatizados por TMS. HPL: Alta carga Parasitaria, LPL: Baixa Carga Parasitaria e NI: Não Infectados.

A análise minuciosa de todos os metabólitos detectados por GC-MS usando as duas técnicas de derivatização (MFC e TMS) permitiu a identificação de 19 metabólitos aonde a abundância relativa desses metabólitos entre os grupos HPL e LPL variou de maneira significativa quando comparados com o grupo NI (valor de 'p' menor que 0,05). Esses metabólitos estão listados no Quadro 1 aonde a direção e número das setas indica o aumento ou a redução de cada metabólito, em vermelho para MCF e em azul para TMS.



Quadro 1 - Comparativo dos metabólitos significantes entre os grupos de animais infectados com *S. mansoni* (HPL e LPH) com o não infectado (NI).

<i>Metabólito</i>	<i>Grupo de estudo</i>		<i>Derivatização</i>
	<i>HPL</i>	<i>LPL</i>	
<i>Malonic acid</i>	↑↑	↑↑↑↑	MCF
<i>Nicotinamide</i>	↑	↑	
<i>Fumaric acid</i>	↑↑↑	↑	
<i>Succinic acid</i>	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
<i>Alanine</i>	↑↑↑	-	
<i>Malic acid</i>	↑	-	
<i>Glycine</i>	↑↑↑↑	-	
<i>2-Oxoglutaric acid</i>	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
<i>cis-Aconitic acid</i>	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
<i>3-Methyl-2-oxovaleric acid</i>	↓	-	
<i>5-Oxotetrahydrofuran-2,3-dicarboxylic acid</i>	↑	-	
<i>Hippuric acid</i>	↓↓↓↓	↑↑↑↑	
<i>Lysine</i>	↓↓↓↓	↓	
<i>Methylmaleic acid</i>	↑↑↑↑	-	TMS
<i>Urea</i>	↑↑↑↑	↓	
<i>Xylose</i>	↑↑↑↑	-	
<i>Ribitol</i>	↑↑↑↑	-	
<i>Pentaric acid</i>	↑↑↑↑	↑	
<i>Citric acid</i>	↑↑↑↑	↑	

Fonte: O Autor

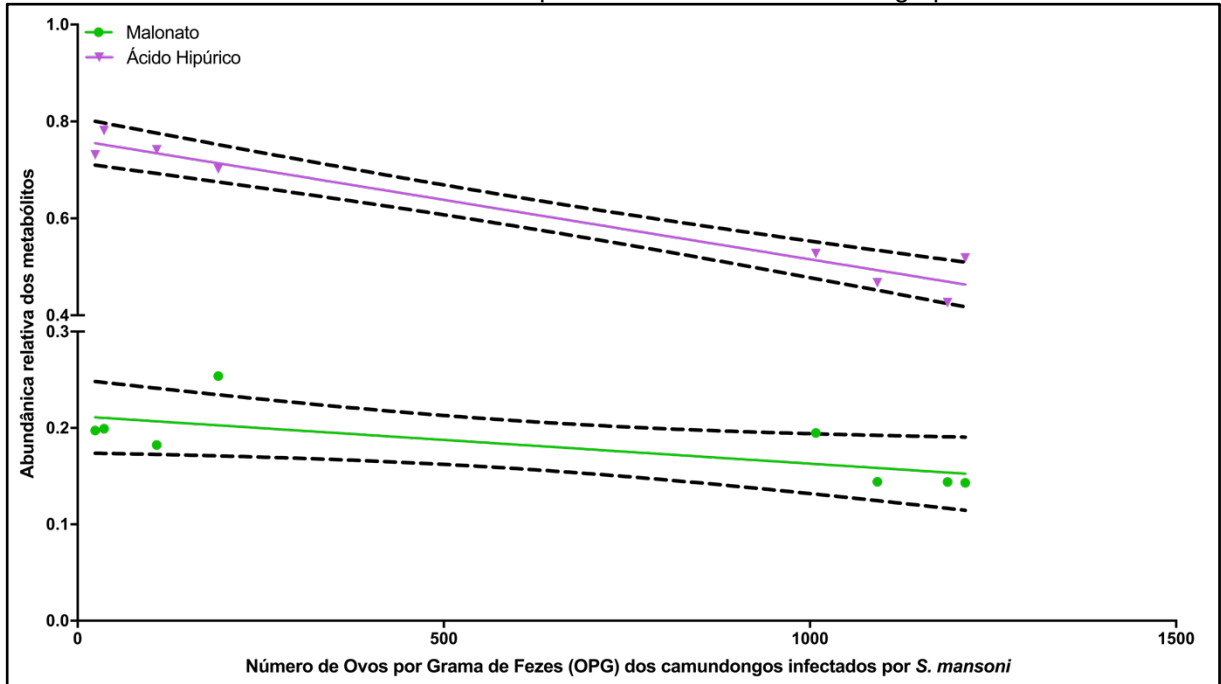
Legenda: ↑ =  $p < 0,05$  ; ↑↑ =  $p$  até 0,005 ; ↑↑↑ =  $p$  até 0,0001 ; ↑↑↑↑ =  $p < 0,0001$ . HPL: Alta carga Parasitaria, LPL: Baixa Carga Parasitaria e NI: Não Infectados.

Na busca de metabólitos que auxiliariam na detecção de baixa carga parasitaria (grupo LPL), é possível observar que a metodologia de derivatização por MCF se mostrou mais promissora do que a derivatização por TMS para a determinação de metabólitos específicos a esse grupo. O método por MCF foi mais eficaz possibilitando a identificação de 13 metabólitos com diferença significativa entre os grupos de estudo já o TMS só possibilitou identificar 6 metabólitos com diferenças estatísticas, dois metabólitos se destacaram como candidatos a marcadores biológicos para o grupo LPL: Malonato e o Ácido hipúrico. Esses dois metabólitos, principalmente o Ácido hipúrico, exibiram uma grande diferença entre os grupos HPL e LPL.

Para dar suporte estatístico a este achado foi realizado o teste de correlação de Pearson para avaliar a associação das variáveis abundância relativa dos metabólitos e OPG (ovos por grama de fezes) dos murinos infectados. Como resultado é possível observar que os metabólitos Malonato e Ácido hipúrico apresentaram uma correlação

negativa (Figura 10), ratificando o interesse dos mesmos para uso na detecção de indivíduos infectados com baixa carga parasitária como os indivíduos do grupo LPL.

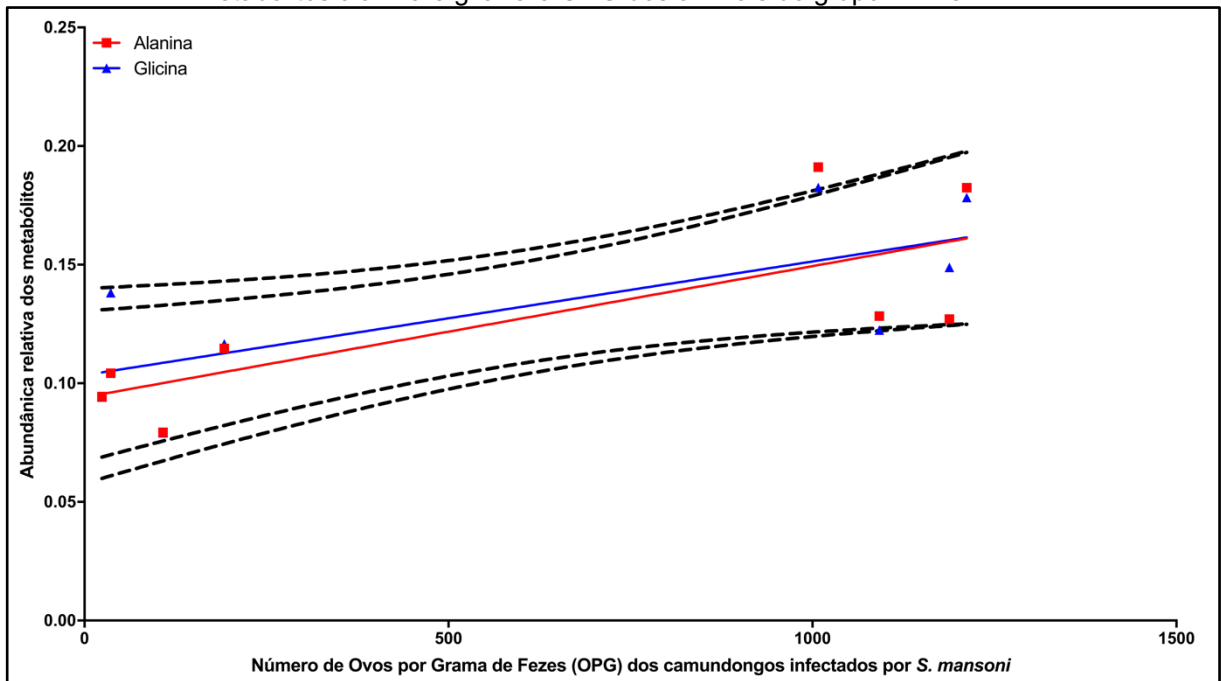
Figura 10 - Regressão linear (negativa) com os dados de correlação entre abundância relativa dos metabólitos malonato e ácido hipúrico e OPG dos animais do grupo HPL e LPL.



Fonte: O autor

Em contraste, o mesmo teste foi aplicado a metabólitos tipicamente elevados na urina de animais do grupo HPL (alta carga parasitária): Alanina e Glicina. Na Figura 11 podemos ver que esses metabólitos demonstraram uma correlação positiva entre o aumento da carga parasitária e seus níveis de abundância relativa. Esse perfil indica os mesmos como bons marcadores para grupos com alta carga parasitária.

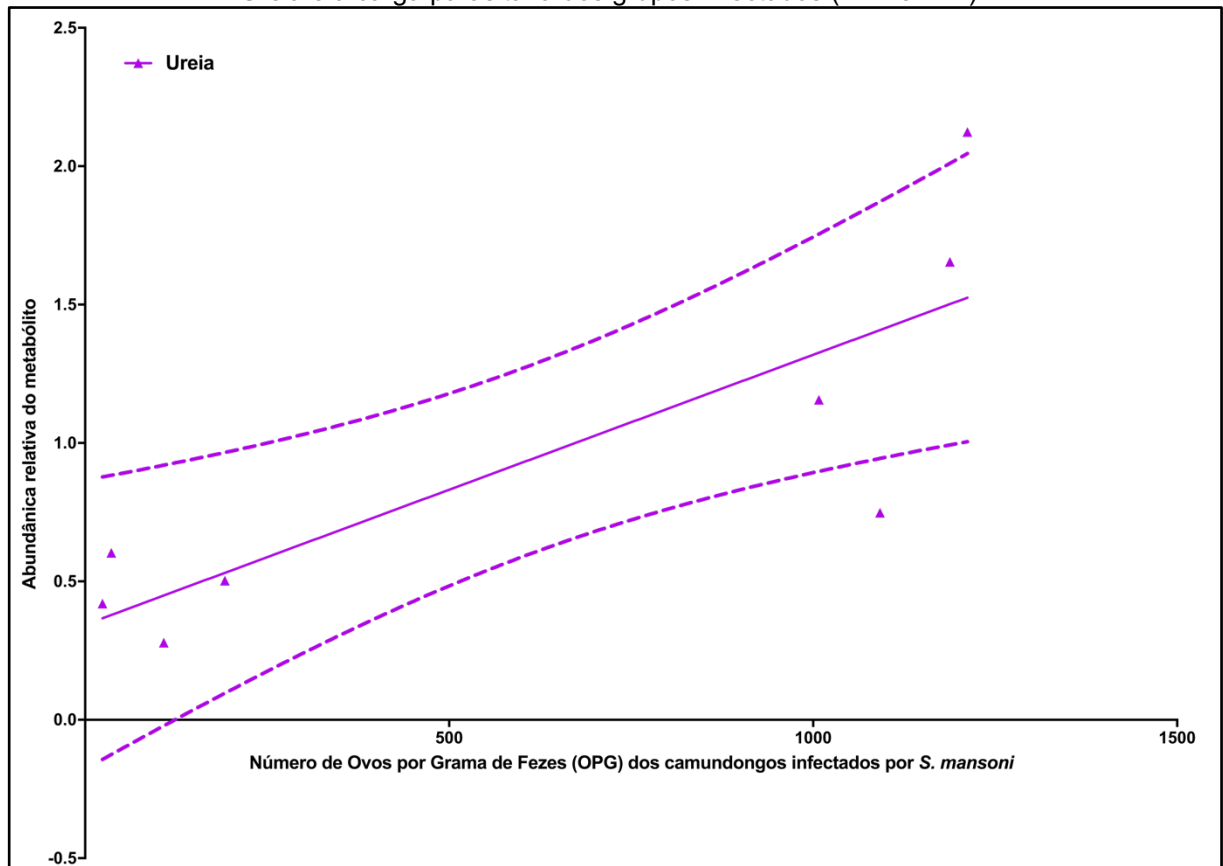
Figura 11 - Regressão linear (positiva) com os dados de correlação entre abundância relativa dos metabólitos alanina e glicina e OPG dos animais do grupo HPL e LPL.



Fonte: O autor

O tratamento com uréase reduziu de maneira homogênea a quantidade de ureia nas amostras, mas ainda assim seus níveis também apresentaram uma correlação positiva com a carga parasitária, exibindo um ângulo da reta bem acentuado na regressão linear (Figura 12).

Figura 12 - Regressão linear (positiva) evidenciando a correlação entre abundância relativa da Ureia e a carga parasitária dos grupos infectados (HPL e LPL).



Fonte: O Autor

## 11 DISCUSSÃO

A aplicação da metabolômica na identificação de novos marcadores biológicos ou alvos para fármacos em infecções parasitárias tem potencial para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e menos invasivas para o diagnóstico e melhoria na vigilância da doença (VILLAS-BÔAS et al., 2007).

Esse estudo focou na avaliação dos metabólitos em amostras de urina provenientes da infecção em modelo animal com baixa carga parasitária do *S. mansoni*. Tendo em vista que o grande problema da doença é a baixa capacidade de detecção de pacientes positivos em áreas de baixa endemicidade usando os métodos parasitológicos convencionais (DIAS et al., 1994; ESPIRITO-SANTO et al., 2015; LIN et al., 2008; ZHANG et al., 2009b).

O processo de derivatização por MCF, que foca na detecção de ácidos orgânicos, se mostrou mais promissor na detecção de moléculas-chaves. Tendo uma distribuição menos heterogênea no PCA, essa abordagem obteve 13 metabólitos com diferença significativa comparando os grupos de animais infectados com o dos não infectados.

Esse estudo comparou a abundância relativa dos metabólitos com a carga parasitária dos grupos infectados e permitiu a identificação do ácido hipúrico e o malonato como indicadores de baixa infecção. Índices alterados do ácido hipúrico foram reportados por uma série de estudos (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008, 2010; LI et al., 2011; WANG et al., 2004). Esses estudos utilizaram a técnica NMR e avaliaram apenas grupos com infecção elevada. A utilização de GC-MS, técnica de maior sensibilidade, possibilitou identificação da alteração desse metabólito também em um grupo com baixa carga parasitária.

O ácido hipúrico é formado pela conjugação da glicina com o cloreto de benzoíla na mitocôndria hepática (GATLEY; SHERRATT, 1977). O estudo de Li et al. (2011) sugere que essa alteração no ácido hipúrico seja decorrente de modificações no co-metabolismo da microbiota intestinal dos animais infectados, tendo em vista que Nicholls et al. (2001) não observaram a presença de ácido hipúrico em urina de ratos “germ-free”.

Um fato relevante desse metabólito é que o mesmo está elevado no grupo de baixa carga parasitária, mas seus níveis estão diminuídos no grupo com alta carga parasitária quando comparados com os animais não infectados. Isso possibilita sua

utilização como um possível marcador biológico dependente da carga parasitária dos indivíduos infectados.

Saric et al. (2008) descreveram o perfil metabolômico da infecção (em grupos de alta carga parasitaria) por *Echinostoma caproni* em modelo animal e observaram que os níveis de ácido hipúrico estavam reduzidos. Sendo assim, há a possibilidade de reação cruzada no uso do ácido hipúrico para avaliação de pacientes com alta infecção por *S. mansoni* e infectados com *E. caproni*, mas o perfil de baixa carga para esquistossomose já não se apresenta da mesma forma que a infecção por *E. caproni*.

Estudos conduzidos por Wu et al. (2010) sugerem que a infecção por *S. mansoni* leve a uma redução da atividade da beta-ureidopropionase, levando assim a um distúrbio no metabolismo dos nucleotídeos derivados da uracila o que poderia refletir na alteração dos níveis do malonato. Singer et al. (2007) fizeram um levantamento dos dados de metabolômica de *S. mansoni* e lendo em conta principalmente os achados de Wang et al. (2004) classificaram o malonato, assim como o ácido hipúrico, como um metabólito relacionado ao co-metabolismo da microbiota intestinal e que a infecção pode modificar a homeostase da simbiose levando a modificações em seus níveis.

O presente estudo também identificou que os níveis de glicina, alanina e ureia apresentaram uma correlação direta com a carga parasitária dos grupos estudados, sendo visualizada uma reta crescente de correlação o que indica que quanto maior for a carga parasitária mais os níveis desses indicadores estarão elevados.

A glicina e alanina são aminoácidos não essenciais, sendo assim não possuem flutuação prandial (WU, 2009). A alanina está intimamente relacionada com o catabolismo da glicina, onde a alanina é convertida em piruvato gerando a glicina a partir de uma molécula de glioxilato (VILLAS-BÔAS et al., 2007). Essa reação ocorre majoritariamente no fígado e por tal motivo Singer et al. (2007) e Li et al. (2011) explicam que essas moléculas estão vinculadas ao dano hepático, alteração presente na infecção por *S. mansoni*, mas não pode ser considerada exclusiva e característica somente da esquistossomose, tendo em vista que estudos de metabolômica com malária também reportaram alterações nesses metabólitos (PENET et al., 2007). Logo o aumento dessas moléculas poderia ser facilmente compreendido, mas não podemos indicar como marcadores biológicos da infecção e sim do dano causado pela mesma.

A ureia é a principal forma de eliminação dos grupos amino derivados dos aminoácidos, e representa mais de 90% dos componentes nitrogenados da urina (MÖLLER; MCINTOSH; VAN SLYKE, 1929). Estudos de métodos diagnósticos em clínica para pacientes com esquistossomose já apontavam a ureia, assim como a creatinina, em níveis elevados como indicadores da infecção por *S. mansoni* (GRAY et al., 2011). Estudos de metabolômica utilizando eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massa (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008) e ressonância magnética nuclear (WANG et al., 2006) também já haviam apontado modificações nos níveis de uréia em modelo animal da esquistossomose.

Estudos avaliando a metabolômica dos estágios evolutivos do *Ascaris lumbricoides* apontaram uma série de moléculas importantes para a comunicação parasita hospedeiro e para diferenciação no desenvolvimento embrionário (DOLD; HOLLAND, 2011; HADLEY, 1980; LIMA et al., 2017), mas não apontaram moléculas passíveis de uso como marcadores biológicos ou metabólitos conflitantes com os achados nesse estudo.

Tendo em vista todos os achados desse estudo e as informações presentes na literatura, ainda há a necessidade de elucidar lacunas no conhecimento atual a respeito da especificidade dos metabólitos achado e suas possíveis reações cruzadas com outras infecções. Se faz necessário a investigação da infecção em humanos e a avaliação do perfil metabolômico em indivíduos poliparasitados para uma melhor escolha de um metabólito mais específico e que não esteja comprometido com reação cruzada.

## 12 CONCLUSÃO

Como proposto inicialmente, os objetivos desse estudo em um modelo murino foram alcançados e indicaram metabólitos com diferença significativa entre os grupos de alta e baixa carga parasitaria. Os resultados desse estudo ratificaram uma série de informações de estudos prévios demonstrando a possibilidade da detecção de metabólitos chaves (que possuem diferença significativa quando comparados com grupos não infectados) mesmo em condições de baixa parasitemia.

Foi visto a importância do ácido hipúrico como marcador biológico, mas com atenção as áreas indenes para *E. caproni*, pois este parasita também altera os níveis desse metabólito. O malonato tende a ser um metabólito promissor para utilização como marcador biológico, pois foi visto nos testes de correlação que o mesmo se modifica proporcionalmente a carga parasitária. A glicina e alanina possuem uma resposta muito sensível a infecção, assim como a ureia, mas todos esses são muito inespecíficos, podendo estar alterado por diversas causas.

Os próximos passos para aprimorar esse estudo é a validação dos seus achados com amostras de campo, onde será avaliado se os resultados poderão ser diretamente aplicados em infecções humanas. Neste caso é importante levar em consideração casos de coinfeção, disfunções hepáticas e possíveis variações na microbiota intestinal. Assim, será possível estabelecer a utilidade de tal análise como ferramenta que venha aprimorar o diagnóstico humano de esquistossomose mansônica em casos de baixa parasitemia.



## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, N. et al. Comportamento da cepa LE de *Schistosoma mansoni*, após passagem em hospedeiro humano infectado acidentalmente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro. v. 19, n. 4, p. 213–218, 1986.
- BARBOSA, C. S. et al. Spatial distribution of schistosomiasis foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 99, n. suppl. 1, p. 79–83, 2004.
- BARBOSA, C. S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 101, n. suppl. 1, p. 55–62, 2006.
- BARBOSA, C. S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 105, n. 4, p. 549–554, 2010.
- BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia Da Esquistossomose No Litoral De Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia. v. 43, n. 4, p. 436–445, 2015a.
- BARBOSA, C. S. et al. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco-Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999-2014). **Acta Tropica**, Basel. v. 164, p. 10–16, 2016.
- BARBOSA, V. S. et al. First report of schistosomiasis on Serrambi beach, Ipojuca, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro. v. 48, n. 6, p. 780–782, dez. 2015b.
- BARRETO, M. L.; SMITH, D. H.; SLEIGH, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London. v. 84, p. 554–555, 1990.
- BLOCH, E. H. In vivo microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore. v. 29, n. 1, p. 62–70, jan. 1980.
- BOUT, D.; SANTORO, F.; CAPRON, A. Déteccion des immunocomplexes dans la bilharziose. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris. v. 5, p. 631–636, 1975.
- BRINDLE, J. T. et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. **Nature Medicine**, London. v. 8, n. 12, p. 1439–1445, 25 dez. 2002.
- BUNDY, J. G. et al. Metabonomic assessment of toxicity of 4-fluoroaniline, 3,5-difluoroaniline and 2-fluoro-4-methylaniline to the earthworm *Eisenia veneta* (rosa): Identification of new endogenous biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York. v. 21, n. 9, p. 1966–1972, set. 2002.

CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. **Projeto Ciência na Estrada: Educação e Cidadania**. Salvador, 2015.

CHAN, E. C. Y.; PASIKANTI, K. K.; NICHOLSON, J. K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, London. v. 6, n. 10, p. 1483–1499, 2011.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 97, n. 7, p. 917–940, 2002.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 99, n. 5, p. 13–19, 2004.

DE VLAS, S. J. et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. **Parasitology**, Cambridge. v. 114, n. 2, p. 113–121, fev. 1997.

DIAS, L. C. et al. Epidemiology of schistosomiasis mansoni in a low endemic area. **Cadernos de Saude Publica**, Rio de Janeiro. v. 10, n. suppl. 2, p. 254–260, 1994.

DING, L. et al. Systems Biological Responses to Chronic Perfluorododecanoic Acid Exposure by Integrated Metabonomic and Transcriptomic Studies. **Journal of Proteome Research**, Washington. v. 8, n. 6, p. 2882–2891, 5 jun. 2009.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes and Infection**, Paris. v. 13, n. 7, p. 632–637, 2011.

DUVALL, R. H.; DEWITT, W. B. An Improved Perfusion Technique for Recovering Adult Schistosomes from Laboratory Animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore. v. 16, n. 4, p. 483–486, 1967.

ESPIRITO-SANTO, M. C. C. et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Areas of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. **BioMed Research International**, New York. v. 2015, p. 1–16, 2015.

FELDMEIERS, H.; POGGENSEE, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. **Acta Tropica**, Basel. v. 52, n. 4, p. 205–220, jan. 1993.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, Cairo. v. 2, n. 3, p. 155–168, 2001.

FUJINAMI, A.; NAKAMURA, H. Experimental studies on the serological reactions in calves experimentally infected with *Schistosoma japonicum*. **Journal of Kyoto**

**Medical Association**, Kyoto. v. 6, p. 224–252, 1909.

GARCÍA-PÉREZ, I. et al. Metabolic fingerprinting of *Schistosoma mansoni* infection in mice urine with capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim. v. 29, n. 15, p. 3201–3206, 2008.

GARCÍA-PÉREZ, I. et al. Bidirectional correlation of NMR and capillary electrophoresis fingerprints: A new approach to investigating *Schistosoma mansoni* infection in a mouse model. **Analytical Chemistry**, Washington. 2010.

GARCÍA, A. et al. Capillary electrophoresis for rapid profiling of organic acidurias. **Clinical Chemistry**, Baltimore. v. 44, n. 9, p. 1905–1911, 1998.

GATLEY, S. J.; SHERRATT, H. S. The synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat liver mitochondria. Submitochondrial localization and kinetics. **The Biochemical journal**, London. v. 166, p. 39–47, 1977.

GAZZINELLI, A. et al. The spatial distribution of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy in the Jequitinhonha Valley in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 101, n. suppl.1, p. 63–71, 2006.

GOMES, E. C. DE S. et al. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco--Brazil. **International journal of health geographics**, London. v. 11, p. 51, 2012.

GOMES, E. C. DE S. et al. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC infectious diseases**, London. v. 14, n. 1, p. 101, 2014.

GRAY, D. J. et al. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, London. v. 342, n. d2651, p. 1–11, 2011.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, London. v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.

HADLEY, N. F. Surface Waxes and Integumentary Permeability: Lipids deposited on or associated with the surface of terrestrial plants and animals help protect them from a lethal rate of desiccation. **American Scientist**, New Haven. v. 68, n. 5, p. 546–553, 1980.

HAGAN, P.; ABATH, F. G. C. Recent advances in Immunity to Human Schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 87, n. suppl. 4, p. 95–98, 1992.

HAMBURGER, J. et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam. v. 44, n. 1, p. 73–80, jan. 1991.

HOLMES, E. et al. The Assessment of Plant Metabolite Profiles by NMR-Based Methodologies. **Planta Medica**, Stuttgart. v. 72, n. 9, p. 771–785, jul. 2006.

HOLMES, E. The evolution of metabolic profiling in parasitology. **Parasitology**, Cambridge. v. 137, n. 9, p. 1437–1449, 2010.

HOSHINO-SHIMIZU, S. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da esquistossomose mansônica. **Suplemento dos Anais da Academia Mineira de Medicina**, Belo Horizonte. v. 14, p. 67–89, 1986.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. Schistosomiasis in Africa: An emerging tragedy in our new global health decade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco. v. 3, n. 9, p. 9–11, 2009.

JOHANSEN, M. V. et al. **Important Helminth Infections in Southeast Asia: Diversity and Potential for Control and Elimination, Part B**. New York city: Elsevier, 2010. v. 73

KATZ, N. A Descoberta da Esquistossomose no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador. v. 78, n. 2, p. 123–125, 2008.

KING, C. H. et al. Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. **Trends in parasitology**, Oxford. v. 22, n. 12, p. 575–82, 2006.

KURIEN, B. T.; EVERDS, N. E.; SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. **Laboratory animals**, London. v. 38, n. 4, p. 333–361, 2004.

LI, J. V. et al. Global Metabolic Responses of NMRI Mice to an Experimental *Plasmodium berghei* Infection. **Journal of Proteome Research**, Washington. v. 7, n. 9, p. 3948–3956, 5 set. 2008.

LI, J. V et al. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasites & vectors**, London. v. 4, n. 1, p. 179, 2011.

LIMA, E. O. et al. **Mass Spectrometry and Metabolomics: New Approaches for Helminth Biochemical Studies**. Spain: InTech, 2017.

LIMA, K. DE M. et al. Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro. v. 48, n. 3, p. 314–320, 2015.

LIN, D. D. et al. Routine Kato-Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. **Parasitology International**, Amsterdam. v. 57, n. 3, p. 281–286, 2008.

LOVERDE, P. T.; CHEN, L. Schistosome female reproductive development. **Parasitology today (Personal ed.)**, Amsterdam. v. 7, n. 11, p. 303–8, 1991.

MATSUMOTO, I.; KUHARA, T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry-rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, New York. v. 15, n. 1, p. 43–57, 1996.

MELO, F. L. et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London. v. 100, n. 11, p. 1049–1055, 2006.

MIDZI, N. et al. Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London. v. 103, p. 45–51, 2009.

MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**, London. v. 80, n. 2, p. 267, 2009.

MÖLLER, E.; MCINTOSH, J. F.; VAN SLYKE, D. D. Studies of urea excretion. II. Relationship between urine volume and the rate of urea excretion by normal adults. **The journal of clinical investigation**, New Haven. v. 6, n. 3, p. 427–465, 1929.

MONTENEGRO, S. M. L.; MONTENEGRO, S. M. L. Imunodiagnóstico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 87, p. 333–335, 1992.

MOTT, K. E. et al. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva. v. 65, n. 2, p. 233–244, 1987.

NICHOLLS, A. W. et al. Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat. **Chemical Research in Toxicology**, Washington. v. 14, n. 8, p. 975–987, 2001.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature reviews. Drug discovery**, London. v. 1, n. 2, p. 153–161, 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, London. v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

OLIVEIRA, L. M. A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York. v. 68, n. 4, p. 416–421, 2010.

PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester. v. 22, p. 2984–2992, 2008.

PEELING, R. W.; SMITH, P. G.; BOSSUYT, P. M. A guide for diagnostic evaluations. **Nature Reviews Microbiology**, London. v. 8, p. S2–S6, 2010.

PENET, M. F. et al. Magnetic resonance spectroscopy reveals an impaired brain metabolic profile in mice resistant to cerebral malaria infected with *Plasmodium berghei* ANKA. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco. v. 282, n. 19, p.

14505–14514, 2007.

PIRAJÁ DA SILVA, M. A. Contribuição para o estudo da schistosomíase na Bahia. **Brazil Medico**, Rio de Janeiro. v. 22, p. 281–283, 1908.

PONTES, L. A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore. v. 68, n. 6, p. 652–656, 2003.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore. v. 66, n. 2, p. 157–162, 2002.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 92, n. 5, p. 669–676, set. 1997.

RESENDES, A. P. D. C.; SOUZA-SANTOS, R.; BARBOSA, C. S. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 21, n. 5, p. 1392–1401, 2005.

REZZI, S. et al. Human Metabolic Phenotypes Link Directly to Specific Dietary Preferences in Healthy Individuals. **Jornal of proteome research**, Washington. v. 6, n. 11, p. 4469–4477, 2007.

ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. **The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines**. London: Academic Press, 1987.

SARIC, J. et al. Metabolic Profiling of an *Echinostoma caproni* Infection in the Mouse for Biomarker Discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco. v. 2, n. 7, p. e254, 2 jul. 2008.

SARIC, J. et al. Panorganismal Metabolic Response Modeling of an Experimental *Echinostoma caproni* Infection in the Mouse. **Journal of Proteome Research**, Washington. v. 8, n. 8, p. 3899–3911, 7 ago. 2009.

SHANE, H. L. et al. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco. v. 5, n. 1, p. 1–7, 2011.

SINGER, B. H. et al. **Exploiting the Potential of Metabonomics in Large Population Studies: Three Venues**. New York city: Elsevier B.V., 2007.

SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature protocols**, London. v. 5, n. 10, p. 1709–1729, 2010.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The Immunology of Schistosomiasis. **Advances in Parasitology**, London. v. 14, n. C, p. 399–422, 1976.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet infectious diseases**, New York. v. 6, n. 7, p. 411–25, 2006.

SUEYASU, Y. Über die komplementbindungs-Reaktion bei mit Schistosomum japonicum künstlich infizierten pferden. **Kyoto Igaku Zassi**, Kyoto. v. 33, p. 466–468, 1916.

TAN, Y. S. et al. Theodor Bilharz (1825-1862): discoverer of schistosomiasis. **Singapore Medical Journal**, Singapore. v. 48, n. 3, p. 184–185, 2007.

TREMATODE lifecycle stages. In: WIKIPEDIA: the free encyclopedia. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trematode\\_lifecycle\\_stages.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trematode_lifecycle_stages.png). Acesso em: 12/05/2016

UTZINGER, J. et al. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**, Cambridge. v. 136, n. 13, p. 1859–1874, 2009.

VALADARES, T. E. et al. Schistosoma mansoni: Aspectos da oviposição da cepa LE' em camundongos infectados com um casal de vermes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo. v. 23, n. 1, p. 6–11, 1981.

VILLAS-BÔAS, S. et al. **Metabolome Analysis: An Introduction**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007.

WANG, Y. et al. Metabonomic investigations in mice infected with Schistosoma mansoni: an approach for biomarker identification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 101, n. 34, p. 12676–81, 2004.

WANG, Y. et al. System level metabolic effects of a Schistosoma japonicum infection in the Syrian hamster. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam. v. 146, n. 1, p. 1–9, 2006.

WANG, Y. et al. Global metabolic responses of mice to Trypanosoma brucei brucei infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 105, n. 16, p. 6127–32, 22 abr. 2008.

WANG, Y. et al. Advances in metabolic profiling of experimental nematode and trematode infections. **Advances in parasitology**, London. v. 73, p. 373–404, jan. 2010.

WATERS, N. J. et al. Metabonomic Deconvolution Of Embedded Toxicity: Application To Thioacetamide Hepato- and Nephrotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, Washington. v. 18, n. 4, p. 639–654, 2005.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosoma mansoni: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. **Parasitology**, Cambridge. v. 92, n. Pt 1, p. 83–100, fev. 1986.

WILSON, R. A.; LAWSON, J. R. An examination of the skin phase of schistosome migration using a hamster cheek pouch preparation. **Parasitology**, Cambridge. v. 80, n. 2, p. 257–66, abr. 1980.

WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, Wien. v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.

WU, J. et al. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco. v. 4, n. 8, p. e807, 2010.

YANG, Y. et al. Metabonomic Studies of Human Hepatocellular Carcinoma Using High-Resolution Magic-Angle Spinning <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy in Conjunction with Multivariate Data Analysis. **Jornal of proteome research**, Washington. v. 6, n. 7, p. 2605–2614, 2007.

YAP, I. K. S. et al. An Integrated Metabonomic Approach To Describe Temporal Metabolic Disregulation Induced in the Rat by the Model Hepatotoxin Allyl Formate. **Jornal of proteome**, Washington. v. 5, n. 10, p. 2675–2684, 2006.

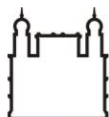
YOSHIMOTO, M. Ueber die komplementbindungsreaktion bei der Schistosomum-Krankheit in Japan. **Zeitschrift Immunitätsforschung**, Stuttgart. v. 4, p. 438–445, 1910.

ZHANG, X. et al. Human Serum Metabonomic Analysis Reveals Progression Axes for Glucose Intolerance and Insulin Resistance Statuses. **Journal of Proteome Research**, Washington. v. 8, n. 11, p. 5188–5195, 6 nov. 2009a.

ZHANG, Y. Y. et al. Evaluation of Kato-Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: A Bayesian modeling approach. **Acta Tropica**, Basel. v. 112, n. 1, p. 16–22, 2009b.



## **ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Recife, 12 de abril de 2016

### Carta – Resposta

**Projeto nº 94/2016**

Ao pesquisador: Dr<sup>a</sup> Constança Clara Gayoso Simões Barbosa

Informo que o projeto “AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO EM MODELO ANIMAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* ” proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em 11/04/2016, seguindo anexo o respectivo Certificado de Aprovação pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente



Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora CEUA/CPqAM

**Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade de Oliveira**  
Coordenadora da Comissão de Ética  
no Uso de Animais – CEUA  
Mat. SIAPE 1554975  
e-mail: [sheilla@cpqam.fiocruz.br](mailto:sheilla@cpqam.fiocruz.br)  
CPqAM/Fiocruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### Certificado de aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO EM MODELO ANIMAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni***” protocolado sob nº 94/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dr<sup>a</sup> Constança Clara Gayoso Simões Barbosa está de acordo com a lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 12/04/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até abril de 2018

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo isogênico BALB/c fêmea	30
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>

We certify that Project “**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO EM MODELO ANIMAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni***” (CEUA Protocol nº 94/2016) coordinated by **CONSTANÇA CLARA GAYOSO SIMÕES BARBOSA** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on April, 12, 2016. In present version this Project in licensed and valid until April 2018.

Recife (PE, BRAZIL) April, 12, 2016

Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora CEUA/CPqAM

**Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade de Oliveira**  
Coordenadora da Comissão de Ética  
no Uso de Animais – CEUA  
Mat. SIAPE 1554975  
e-mail: [sheilla@cpqam.fiocruz.br](mailto:sheilla@cpqam.fiocruz.br)  
CPqAM/Fiocruz