

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Vivian Favero

**APRIMORAMENTO DA DETECÇÃO DE OVOS DE *Schistosoma mansoni* EM
SEDIMENTO PRODUZIDO PELO METODO HELMINTEX®**

Porto Alegre- RS- Brasil

2014

Vivian Favero

**APRIMORAMENTO DA DETECÇÃO DE OVOS DE *Schistosoma mansoni* EM
SEDIMENTO PRODUZIDO PELO METODO HELMINTEX®.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Graeff Teixeira

Co-Orientadora: Dra. Alessandra L. Morassutti

Porto Alegre- RS- Brasil

2014

Agradecimentos

Nos últimos dois anos, inúmeras batalhas me foram impostas, e conquistei muitas vitórias, graças aos meus amigos que nunca me abandonaram e a conhecidos que com muita bondade e força de vontade doaram um pouco do seu tempo, ou algumas palavras que me fizeram acreditar que tudo é possível!

À minha amada mãe, eterna lembrança que embala meus dias e grande exemplo de amor, carinho e dedicação. Um anjo colocado em meu caminho que me ensinou a lutar e ter fé. Sei que se estivesse aqui ao meu lado hoje seria a pessoa mais orgulhosa do mundo, e que estaria festejando em grande estilo mais esta conquista. Sempre te amarei minha estrelinha!

A meu pai, um homem guerreiro e batalhador que nunca se deixou abater e que sempre aturou minhas maluquices e decisões de vida, sempre me amparando e direcionando até nos momentos mais difíceis. Tu és para mim uma lição de vida, pois sei que para você a vida foi dura e que mesmo com seu jeito direto e muitas vezes fechado, fez o que pôde para me educar da melhor forma. Hoje posso dizer com todas as palavras do mundo TE AMO e tenho certeza de que não teria chegado até aqui sem tua ajuda e força. Ao meu irmão que em seus erros e acertos sempre tenta fazer o melhor.

Ao meu orientador Dr. Carlos Graeff-Teixeira, grande mestre, que me deu a oportunidade de fazer parte do grupo de Parasitologia e ser recebida pela Doutoranda Renata Russo, que me acolheu e se transformou em uma amiga/irmã ou mais do que isso, uma mãe muitas vezes. Vocês sempre tiveram muita fé em mim e não deixaram de acreditar nunca que eu poderia muito mais do que eu mesma tive a capacidade de imaginar. Agradeço ao dois pela paciência e confiança depositada em mim.

À Dra. Alessandra Morassutti que com seu jeito atencioso sempre soube me ensinar, acalmar e guiar, mesmo quando achava que estava tudo perdido.

Ao grupo todo de Parasitologia da PUCRS, que me ensinou muito nestes dois anos de convívio: Joana Borges, Bianca Cognato, Vanessa Frey, Catieli Gobetti, Carla Muller, Thaise Paim, Silvana Lunardini, Priscilla Pedersen, Nicole Bridi, Angélica Ramirez, todos os alunos de Iniciação Científica e em especial à Carolina Verissimo que sempre esteve ao meu lado ajudando e se transformou ao longo desse convívio em uma grande amiga.

Agradeço à minha amiga de infância e irmã de alma Diana Coser, pelo carinho, força, ajuda e fé.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui e que torceram por mais esta minha conquista.

Resumo

A esquistossomose é endêmica em 74 países, afetando mais de 200 milhões de pessoas. No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é o único agente etiológico da esquistossomose, que atinge 19 estados. Medidas de controle e tratamento efetivo podem resultar em diminuição da carga parasitária de indivíduos com a forma severa da doença. Assim, quando não forem utilizados métodos diagnósticos com sensibilidade adequada para acompanhamento, essas medidas podem dificultar o diagnóstico, favorecendo a permanência da infecção por longos períodos, além da contaminação ambiental e conseqüentemente a exposição à população local à reinfecção. Nestas áreas, ou onde ocorreu introdução recente de *S. mansoni*, os métodos parasitológicos clássicos para encontrar ovos nas fezes não demonstram eficácia. Embora as técnicas imunológicas e moleculares sejam consideradas atualmente as principais ferramentas de diagnóstico, são necessários métodos parasitológicos para a confirmação da infecção. Recentemente, o Helmintex® foi descrito como um método diagnóstico altamente sensível que isola ovos a partir de 30 gramas de fezes através da interação dos ovos com microesferas paramagnéticas em um campo magnético. Apesar da sensibilidade, sua limitação está no número de lâminas a serem analisadas, tornando o processo demorado e inviável para aplicação na rotina clínica. Neste contexto, este trabalho abre perspectivas para a utilização de novas ferramentas na tentativa de otimizar a detecção de ovos de *S. mansoni* na última etapa do método Helmintex®, utilizando a quimioluminescência, e a coloração por ninidrina. Outra alternativa testada foi a coloração do sedimento final com ninidrina. Os sedimentos de Helmintex® contendo ovos de *S. mansoni* foram fixados com etanol 70 % e depositados em papel filtro Whatman Grau 541, imersos em uma solução de ninidrina:etanol (30:70%) para posterior visualização dos ovos corados em microscópio óptico. O tempo de leitura de cada filtro foi cronometrado. As condições ideais para incubação com a ninidrina foram estabelecidas em 15 minutos à 24 °C. O tempo de leitura para cada amostra foi, em média, de 23 minutos. Em comparação com o método Helmintex® original, a utilização de ninidrina diminuiu o tempo de leitura do sedimento final em, ao menos, 450 minutos. Os resultados deste trabalho mostraram que a implementação de novas ferramentas em métodos diagnósticos já existentes podem contribuir para um melhor desempenho de técnicas sensíveis, porém com aplicação limitada em estudos de campo, e abrem perspectivas para novos estudos que visam investigar e otimizar etapas primordiais de métodos de concentração.

Palavras-chave: Esquistossomose; diagnóstico; Helmintex®; quimioluminescência; ninidrina.

Abstract

Schistosomiasis is endemic in 74 countries, affecting more than 200 million people. In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only causative agent of schistosomiasis, which affects 19 states. Control measurements and effective treatment can result in a decrease of the parasitic load of individuals with the severe form. In this matter, when diagnostic methods with adequate sensitivity for monitoring are not used, those measurements may difficult diagnosis, favoring the persistence of the infection for long periods, as well as the environmental contamination and consequently exposure to local population reinfection. In these areas, or where there was recent introduction of *S. mansoni*, classic parasitological methods to find eggs in feces are not efficient. Although immunological and molecular techniques are currently considered as main diagnostic tools, parasitological methods re necessary to confirm the infection. Helmintex™ has been recently described as highly sensitive diagnostic method that isolates eggs from 30 gram of feces through the interaction of eggs with paramagnetic microspheres in a magnetic field. Despite the sensibility, its limitation lies in the number of slides to be analyzed, making the process time consuming and not applicable for clinical routine. In this context, this work opens perspectives for the use of new tools in an attempt to optimize *S. mansoni* egg detection in the last step of the Helmintex™, using chemiluminescence, and ninhydrin staining. Another alternative tested was the ninhydrin staining. Helmintex™ sediments containing *S. mansoni* eggs were fixed with 70% ethanol and deposited on Whatman Grade 541 filter paper, immersed in a solution of ninhydrin:ethanol (30: 70 %) for later eggs visualization at the optical microscope. Reading time for each filter was counted and registered. Ideal conditions for incubation with ninhydrin were established in 15 minutes at 24 °C. Reading time for each sample was, in general, of 23 minutes. When compared to the original Helmintex™ method, the use of ninhydrin decreased the reading time of the final sediment in, at least, 450 minutes. The results of this work showed that the implementation of new tools in existent diagnostic methods may contribute to a better performance of sensitive techniques with limited application in field studies, and open perspectives to new studies that aim to investigate and to optimize primordial steps of concentration methods.

keywords: Schistosomiasis; diagnostics; Helmintex™; chemiluminescence; ninhydrin

Sumário

1. Introdução	01
1.1. A esquistossomose.....	01
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i>	02
1.3. O ciclo biológico.....	02
1.4. Os ovos	03
1.5. Diagnóstico.....	06
2. Objetivos e justificativa	08
2.1. Objetivo geral.....	09
2.2. Objetivos específicos.....	09
3. Materiais e Métodos	10
4. Resultados	15
5. Discussão	24
6. Conclusões finais	28
7. Referências	29
8. Anexo	38
8.1. Protocolo ETT.....	38
8.2. Termografia.....	39
8.3. Artigo submetido á revista International Journal for Parasitology.....	41

1. Introdução

1.1. A esquistossomose

A esquistossomose humana é uma parasitose que pode levar a uma doença crônica, sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes em humanos (Santos & Chaves, 1997). Em pleno século XXI, a esquistossomose ainda é considerada um problema de saúde pública, estimando-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo (Chitsulo *et al.*, 2000; WHO, 2009) e 779 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (Steinmann *et al.*, 2006). A doença é causada por um helminto trematódeo do gênero *Schistosoma*, e as espécies que têm importância epidemiológica são: *Schistosoma haematobium*, encontrada principalmente na África, *Schistosoma mansoni*, encontrada na América Latina e na África, *Schistosoma japonicum*, endêmica na China e no Extremo Oriente, *Schistosoma mekongi*, encontrada no Vale do Rio Mekongi, no Camboja, e *Schistosoma intercalatum*, encontrada no interior da África Central (Barsoum, 1993). É uma infecção associada diretamente a aspectos socioeconômicos, principalmente à pobreza e a falta de saneamento básico, evidenciando a distribuição desigual dos diferentes grupos de risco (Barbosa *et al.*, 1996).

No Brasil, o *S. mansoni* é o único agente etiológico da esquistossomose (Katz & Peixoto, 2000). O parasito pode ter chegado com a vinda de imigrantes orientais, asiáticos e escravos africanos no período colonial, instalando-se graças à presença de hospedeiros intermediários suscetíveis, caramujos do gênero *Biomphalaria*, e às condições ambientais favoráveis (Neves *et al.*, 2010). Acredita-se que no Brasil existam 2,5 a 6 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2009). Sua distribuição atinge vários estados com áreas endêmicas no Nordeste, sobretudo em Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia, Maranhão e também no norte de Minas Gerais. Há, no entanto, focos isolados de transmissão nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2013). Na região Sul, o primeiro caso autóctone da doença foi descoberto em janeiro de 1997, quando foram encontrados ovos de *S. mansoni* em um paciente hospitalizado no município de Sapucaia e residente em Esteio (Graeff-Teixeira *et al.*, 1999). Desde então, o grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS vêm estudando este foco.

1.2. *Schistosoma mansoni*

S. mansoni apresenta sexos separados, o macho mede cerca de 1 cm, apresentando cor esbranquiçada com tegumento recoberto por tubérculos e canal ginecóforo que alberga a fêmea, que mede cerca de 1,5 cm (Figura 1), esta apresenta cor mais escura devido ao ceco com sangue semi-digerido (Neves *et al.*, 2010). O *S. mansoni* possui diferentes estágios de desenvolvimento (adulto, ovo, miracídio, esporocitos, cercárias e esquistossômulos), cada qual com sua peculiaridade (Souza *et al.*, 2011). Vermes possuem longevidade, em geral, de três a cinco anos, podendo chegar a 30 anos (Hinrichsen, 2005; Prata, 2007).



Figura 1: Macho e fêmea de *Schistosoma mansoni* vistos em microscópio eletrônico. (Adaptado de Beltran *et al.*, 2008).

1.3. O ciclo biológico

O parasito atinge a fase adulta no sistema vascular do homem, alcançando as veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas darão início à postura dos ovos, que irão atravessar a mucosa intestinal e alcançar a luz do intestino, saindo junto com as fezes (Neves *et al.*, 2010). Uma vez no meio ambiente, os ovos maduros sofrem influência da baixa osmolaridade do meio, de estímulos luminosos e da temperatura, o que leva a intensos movimentos da larva e ruptura da casca do ovo, permitindo a eclosão do miracídio, infectante ao hospedeiro intermediário (Ottolina, 1957; Haberl *et al.*, 1995). No interior do molusco, o parasito se multiplica assexuadamente, dando origem às cercárias que, através de estímulos externos, como

luminosidade e temperatura, serão liberadas na água após 20 ou 30 dias, sendo atraídas pelo calor do corpo do hospedeiro definitivo, um vertebrado (Neves *et al.*, 2010). Quando o homem entra em contato com águas contaminadas com cercárias, estas iniciam a sua penetração ativa na pele através da ação mecânica, com movimentos da cauda e do corpo (Figura 2). No momento da penetração, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos que migram pela circulação sanguínea até o sistema porta hepático, onde irão amadurecer e transformar-se em vermes adultos dentro de 25-28 dias (Coura, 2007).

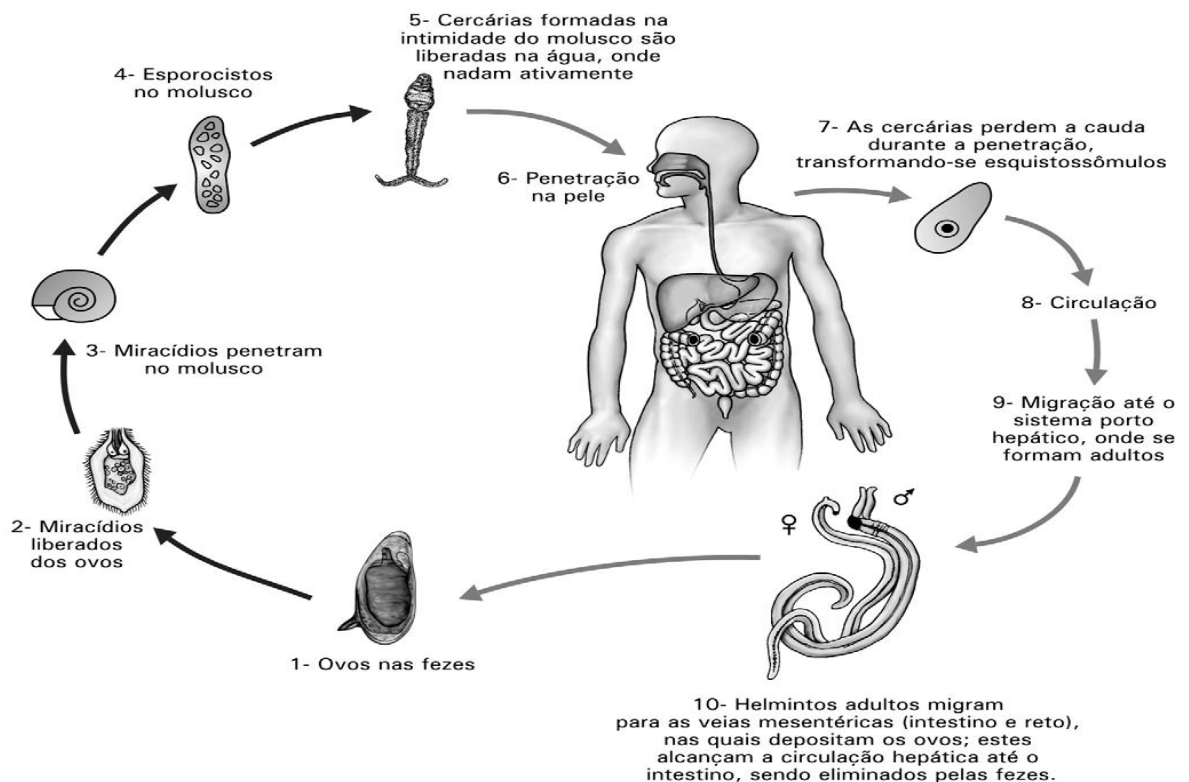


Figura 2: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* (Adaptado de Souza *et al.*, 2011).

1.4. Os ovos

O ovo do *S. mansoni* é muito típico, medindo, em média, 150µm de comprimento por 65µm de largura, possuindo o polo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso, com um espinho lateral saliente e agudo em suas proximidades (Figura 3) (Ford & Blankespoor, 1979;

Karl *et al.*, 2013). As fêmeas eliminam cerca de 300 ovos imaturos, por dia, no interior das vênulas mesentéricas inferiores (Prata 1957; Pellegrino e Coelho, 1978; Rey, 2001), podendo chegar a 400 por dia (Neves *et al.*, 2010). É considerado o principal agente patológico da infecção, devido à excreção de proteínas quando maduro (Prata, 1957; Dewalick *et al.*, 2011). Os órgãos mais afetados são o fígado e o intestino, onde se desenvolvem granulomas contendo ovos no seu interior (Prata, 1957; Badiale *et al.*, 2005), levando a forma severa da doença caracterizada por fibrose periportal do fígado e hipertensão portal ou pulmonar (Rodrigues *et al.*, 2009).

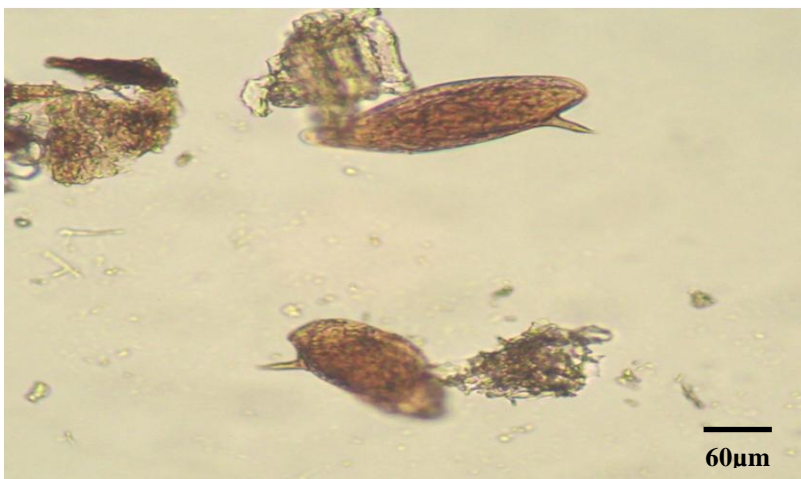


Figura 3: Imagem de ovos de *Schistosoma mansoni* vistos em microscopia óptica com aumento de 400x em sedimento Helmintex®. Laboratório de Parasitologia Biomédica da PUCRS 2012.

Os ovos passam por cinco etapas de maturação com base em uma relação simples entre o embrião e os tamanhos de casca de ovo (Vogel, 1942; Prata, 1957). Jurberg e colaboradores (2009) sugerem duas etapas pré-embriônicas que ocorrem dentro da fêmea de *S. mansoni*, e oito estágios embrionários após a postura dos ovos. Recém-depositados, os ovos não possuem estruturas complexas entre a casca e o embrião, mas estes aparecem durante o desenvolvimento (Neill *et al.*, 1988). Dessa forma, a maturação dos recém-produzidos, que simplesmente consiste da casca do ovo reticulado em torno do óvulo e as células vitelínicas, leva cerca de uma semana. Neste período, o vitelo proporciona nutrientes para o desenvolvimento do miracídio, que também obtém nutrientes do hospedeiro. Conforme o desenvolvimento avança, a casca se torna mais espessa, envolvendo completamente o conteúdo dos ovos, separando-os da casca. (Ashton *et al.*, 2001). Quando maduros são transportados e expulsos para o lúmen intestinal (Lenzi *et al.*, 1991),

estima-se que entre um terço e metade desses ovos percorram este caminho, e os demais seguem o fluxo sanguíneo (DeWalick *et al.*, 2011). Apresentam uma expectativa de vida de 24 horas quando em fezes líquidas, ou cinco dias em fezes sólidas (Neves *et al.*, 2010).

A casca do ovo apresenta aspecto liso à microscopia ótica, porém à microscopia de varredura apresenta uma aparência granulada devido à presença de microespinhos que formam uma espécie de tapete sobre a superfície (Figura 4) (Neill *et al.*, 1988; Karl *et al.*, 2013). Apresenta-se endurecida e possui coloração marrom-claro-transparente, devido principalmente a ligações cruzadas de proteínas quinonas, que são dependentes da atividade da tiorisnase, uma glicoenzima contendo cobre. Cerca de um terço das proteínas na casca dos ovos de *S. mansoni* são proteínas celulares comuns, entre elas a p40, HSP-70, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e tiorredoxina peroxidase (Mathieson & Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011). Estudos sobre os ovos de *S. mansoni* mostraram que o Fe e o Cu fazem parte da constituição das cascas de seus ovos (Karl *et al.*, 2013). Neste mesmo estudo, observaram que os ovos de *S. mansoni* possuem aproximadamente 0,74 mg / g de um material que continha ferro, fósforo e oxigênio, sugerindo ser um fosfato de ferro.

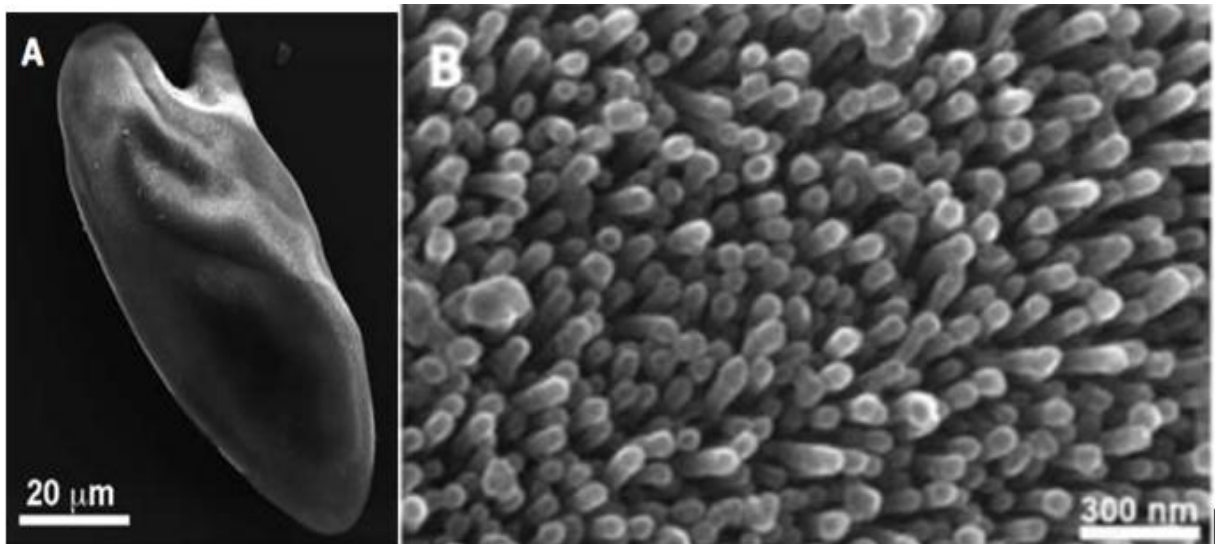


Figura 4: Ovo de *Schistosoma mansoni* visualizado em microscopia eletrônica de varredura. A: Imagem do ovo inteiro. B: Detalhamento da superfície (Adaptado de Karl *et al.*, 2013).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico padrão ouro da esquistossomose é feito através da direta visualização dos ovos nas fezes do indivíduo ou de alguma outra estrutura parasitária através de exames histopatológicos, sobretudo da mucosa retal (Neto *et al.*, 2008; Knopp *et al.*, 2011; Albonico *et al.*, 2012; Levecke *et al.*, 2014). Como alternativa aos métodos parasitológicos, são utilizados imunodiagnósticos (Cesari *et al.*, 2005; Sulahian *et al.*, 2005), detecção de DNA do parasito através da PCR (Pontes *et al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2006), e detecção direta de antígenos no soro (Van Lieshout *et al.*, 2000). Embora estes métodos sejam recomendados devido à eficácia e sensibilidade que apresentam, principalmente, em áreas de baixa prevalência, não estabelecem a intensidade da infecção, e não servem como diagnóstico da infecção ativa, uma vez que os resultados das provas imunológicas podem permanecer positivos por muito tempo, mesmo após o tratamento da infecção (Sturrock, 2001).

Os métodos parasitológicos apresentam baixo custo operacional e praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária (Carvalho *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2013). A exigência para uma ferramenta diagnóstica que apresente viabilidade de custos e bom desempenho técnico deve acompanhar os níveis de infecção. Áreas onde a infecção se apresenta com níveis altos, um teste com sensibilidade moderada é aceitável (McCarthy *et al.*, 2012). No entanto, também devem apresentar desempenho suficiente para detectar alterações na prevalência e na intensidade de infecção (Solomon, *et al.*, 2012), e isso requer uma sofisticada e sensível abordagem diagnóstica, com um aumento do tamanho da amostra ou do número de lâminas (Enk *et al.*, 2008).

Os métodos comumente utilizados incluem microscopia direta, etapas de sedimentação, filtração e concentração (OMS, 1994). A técnica de Hoffman, Pons & Janer (Hoffman *et al.*, 1934) baseia-se na sedimentação espontânea, e embora não apresente a quantificação de ovos nas fezes, permite sua detecção. O método de Kato-Katz é uma técnica diagnóstica parasitológica amplamente utilizada e recomendada atualmente pela Organização Mundial de Saúde em estudos epidemiológicos para a identificação da esquistossomose intestinal. Consiste na clarificação de 40-50 mg de fezes comprimidas em um orifício e cobertas por uma lâmina de celofane embebida em verde de malaquita (Katz *et al.*, 1972). Possui especificidade de 100%, porém a sensibilidade varia de acordo com a prevalência e a intensidade da infecção, bem como com o número de

amostras de fezes coletadas e o número de lâminas preparadas para a visualização (Teixeira *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2011), por isso apresenta bom desempenho no diagnóstico de infecções moderadas e pesadas, mas pode levar à ocorrência de casos falso-negativos e o não estabelecimento da real prevalência quando aplicado em áreas de baixa endemicidade, mesmo quando o uso de modelagem matemática a técnica é aplicada (Enk *et al.*, 2008). O método de gradiente salino, que consiste na sedimentação diferencial de 5 g de fezes quando submetidas a um fluxo lento e contínuo de solução salina, vem apresentando maior sensibilidade em estudos de campo quando comparado ao método de Kato-Katz (Coelho *et al.*, 2009).

Um avanço significativo foi obtido com o desenvolvimento do Helmintex®, técnica coparasitológica altamente sensível que permite o processamento de uma amostra de 30 g de fezes, através de uma sequência de passos de concentração, que termina com o isolamento dos ovos pela interação destes com esferas paramagnéticas, em um campo magnético (Teixeira *et al.*, 2007). Estudos mostram que o Helmintex® é mais sensível que o método de Kato-Katz (Caldeira *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012), alcançando 100% de sensibilidade com o limite de até 1.3 ovos por grama de fezes (Teixeira *et al.*, 2007). Apesar da alta sensibilidade deste método, o Helmintex® possui desvantagens como a não aplicabilidade em estudos de campo, sendo necessário seu processamento em laboratórios equipados, também ao grande número de lâminas geradas a partir do sedimento final produzido, consumindo muito tempo para completa leitura de cada amostra.

2. Objetivos e justificativa

Locais com foco de recente instalação, como é o caso do município de Esteio, onde os indivíduos infectados apresentam menos de um ovo por grama de fezes (Graeff-Teixeira *et al.*, 2004), ou mesmo em locais onde a quimioterapia preventiva diminuiu a carga parasitária (Abath *et al.*, 2006), a necessidade de um teste diagnóstico confiável, sensível e aplicável em campo é de extrema importância tanto no levantamento epidemiológico quanto no acompanhamento de cura. O método Helmintex® é uma técnica diagnóstica sensível, porém demanda muito tempo e esforço para conclusão da leitura da amostra. Isso se deve ao elevado número de lâminas a serem processadas e analisadas ao microscópio óptico.

A introdução de metodologias que possam facilitar a visualização dos ovos ao Helmintex® pode contribuir para a otimização do método. Uma das alternativas seria o uso da quimioluminescência, que é a produção de radiação luminosa eletromagnética, inclusive ultravioleta e infravermelho, gerada por uma reação química (Ferreira & Rossi, 2002).

Outra alternativa seria a utilização da ninidrina para coloração dos ovos, como utilizada por Bell em 1963. Neste método, Bell filtrou uma quantidade conhecida de fezes, em telas de malhas, e em papel filtro, onde os ovos ficaram retidos, para posterior exposição à ninidrina e submetidos à temperatura de 37 °C por 12 horas. A ninidrina é um poderoso agente oxidante usada na detecção de aminoácidos originando um composto púrpura (Plummer & David J, 1978).

Com isso, a idéia deste trabalho foi aliar a coloração dos ovos por ninidrina e a reação de quimioluminescência à fase final de leitura do Helmintex®, tornando o método, já sensível, mais rápido, eficiente e aplicável a estudos de campo.

2.1. Objetivo geral

Aprimorar a detecção de ovos de *Schistosoma mansoni* na etapa final do Helmintex®.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a reação de emissão de luz visível em ovos de *S. mansoni* e outros helmintos, com o uso de quimioluminescência;
- Verificar a diferença de reatividade do agente quimioluminescente entre ovos de *S. mansoni* provenientes de cultivo *in vitro*, fígado de camundongos experimentalmente infectados e fezes de camundongos e humanas;
- Confirmar a utilidade de ninidrina para coloração de ovos de *S. mansoni* e outros helmintos;
- Padronizar a redução do tempo e o ajuste da temperatura da coloração com ninidrina dos ovos de *S. mansoni*.

5. Discussão

A baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos torna-se mais evidente nas infecções com baixa carga parasitária, em áreas endêmicas de baixa prevalência da infecção, nos indivíduos com exposição recente ou tardia e, ainda, no período pós tratamento (Noya *et al.*, 1999). Nessas áreas, o diagnóstico da esquistossomose demanda o uso de técnicas diagnósticas mais sensíveis. Dentre os métodos existentes, destaca-se a detecção de antígenos: como o antígeno catódico circulante (CCA) e o anódico circulante (CAA) através do ELISA (Van Lieshout *et al.*, 2000); a detecção de antígenos solúveis de *S. mansoni* (SmSEA), e a utilização do fluido de transformação cercarial (SmCTF). E ainda a detecção de anticorpos como o MAMA (Abdel-Fattah *et al.*, 2011). No entanto, a ocorrência de falsos positivos e a comparação da sensibilidade de detecção de antígenos com a visualização por microscopia óptica (Bergquist *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2012), fazem com que estas técnicas sejam usadas como alternativas em áreas com alta intensidade de infecção e como método complementar em locais com baixas prevalência (Van Lieshout *et al.*, 2000).

O uso de métodos diretos como a visualização de algumas estruturas parasitárias ao microscópio óptico, não costuma ocorrer em áreas onde a maioria dos portadores elimina menos de 100 ovos do parasita por grama de fezes. A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso do método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) em estudos de campo. Enk e colaboradores (2008) demonstram que a utilização de apenas uma única amostra examinada por este método não é suficiente para o diagnóstico da infecção em áreas de baixa endemicidade, e que a utilização de modelagem matemática melhoraria o método, porém não o aproxima da prevalência verdadeira. Sendo assim, o desenvolvimento de outras técnicas coproscópicas baseadas na sedimentação de um volume maior de fezes, centrifugação e detecção de ovos, como o gradiente salino (Coelho *et al.*, 2009), busca maior sensibilidade, mas são mais trabalhosos devido ao grande volume final produzido a ser analisado através de microscopia.

Tendo em vista esta dificuldade o presente trabalho buscou a implementação e a adaptação de duas novas ferramentas na etapa de detecção dos ovos no sedimento produzido pelo Helmintex®, pois uma das desvantagens desta técnica é o tempo consumido para a leitura do número total de lâminas a partir do sedimento final.

O primeiro teste realizado foi o emprego da ninidrina no sedimento final do Helmintex®. Bell, em 1963, descrevia a ninidrina como corante de ovos de *S. mansoni*. Quando os ovos eram incubados por 12 horas em estufa a 37°C, apresentavam-se com a cor roxa. Neste trabalho, aplicamos a metodologia proposta por Bell, com a modificação do tempo de incubação para 15 minutos à temperatura de 24°C. Os resultados obtidos mostraram que a utilização da ninidrina no sedimento final do Helmintex® resultou em uma diminuição significativa no tempo de leitura do sedimento total, caindo de 8 horas usuais, para menos de 30 minutos. Uma observação no emprego da ninidrina foi a visualização de ovos de *Fasciola hepatica* e ancilostomídeos em algumas amostras obtidas de indivíduos, o que poderia ampliar as possibilidades de uso do Helmintex®.

O segundo conjunto de experimentos testou a utilidade de uma reação de quimioluminescência (Ferreira & Rossi, 2002). A casca do ovo de *S. mansoni* é uma estrutura rígida devido ao entrelaçamento de proteínas quinonas, processo conhecido como processo tanante da quinona, e é dependente da atividade de enzimas tirosinases (DeWalick *et al.*, 2011). Estas enzimas, em alguns invertebrados, são estabilizadas por íons metais bivalentes, incluindo o ferro (Sun & Waite, 2005). Outra enzima recentemente descoberta como parte integrante da casca do ovo é a tioredoxina peroxidase (DeWalick *et al.*, 2011; Mathieson & Wilson, 2010). A tioredoxina peroxidase é membro de uma família de proteínas inicialmente descobertas a partir de levedura, importante na proteção da oxidação da síntese de glutamato por íons de metal, atuando efetivamente como uma peroxidase (Zhang *et al.*, 1997). Portanto, os resultados deste trabalho sugerem que, a emissão de luz em soluções contendo ovos de *S. mansoni* obtidos de fígados de camundongos e cultivo *in vitro*, é gerada por um processo de oxidação graças à presença de elementos metálicos presentes nos ovos (Karl *et al.*, 2013) ou outros agentes orgânicos oxidantes como peroxidases (DeWalick *et al.*, 2011).

A cor e a intensidade de emissão luz gerada, apresenta um comprimento de onda (λ_{\max} de emissão) de 431 nm quando utilizada água como solvente (Ferreira & Rossi, 2002). Dados quantificáveis forneceriam novas possibilidades para a utilização da quimioluminescência, como sua padronização através da detecção de luz gerada e associações com a

quantidade de ovos. A utilização de um luxímetro se mostrou efetiva para amostras contendo mais de 100 ovos, mas não demonstrou sensibilidade para amostras menores.

Uma importante observação nos resultados utilizando a quimioluminescência, no entanto, é que, em amostras contendo ovos de fezes, tanto de camundongos quanto de humanos, não foi observada reação luminosa. Uma hipótese é de que a capacidade de interferência na oxidação do agente quimioluminescente é dependente do grau de maturidade do ovo, já que ovos de cultivo e de fígado mostraram reação positiva. Ovos de *S. mansoni* após o período pré-embriônico, passam por 8 estágios de desenvolvimento (Jurberg *et al.*, 2009). Ovos recém-produzidos consistem de uma casca reticulada que envolve o óvulo e as células vitelínicas, não possuindo estrutura complexa entre a casca e o embrião, e levam cerca de uma semana para maturar (DeWalich *et al.*, 2001). Conforme o desenvolvimento avança, a casca se torna mais espessa, envolvendo completamente o conteúdo dos ovos, separando-os da casca do ovo (Ashton *et al.*, 2001). Em contrapartida, ovos encontrados nas fezes já passaram por toda etapa de amadurecimento, e o contato com o bolo fecal e tecidos do hospedeiro, pode acabar envolvendo o ovo com materiais (Smith, 1974; Pino-Heiss *et al.*, 1985), que dificultam o processo de quimioluminescência.

Curiosamente, nos experimentos realizados com trinta amostras do sedimento Helmintex® obtidas no inquérito realizado no município de Januária – MG, dez apresentaram reação de emissão de luz. Dessas amostras, em cinco não foram observados ovos de helmintos. O agente quimioluminescente teve a sua atividade observada em amostras com a presença de glicose, medicamentos como paracetamol, ácido tartárico, captropil e catecolaminas (Ferreira & Rossi, 2002), peroxidases de vegetais e agentes oxidantes fortes (Cremer *et al.*, 2003), e ainda o próprio ferro. As fezes de indivíduos normais apresentam aproximadamente 0,2 a 0,9 mg/dia de ferro (Lund *et al.*, 1999). Também, dependendo da dieta de cada indivíduo, material vegetal poderá ser encontrado, bem como o uso de medicamentos, isso poderia explicar a reação de emissão de luz nos sedimentos que estavam livres de ovos. Os ovos isolados de fezes apresentaram emissão de luz, porém algumas amostras de fezes que continham ovos apresentaram emissão de luz, isso poderia ser devido aos resquícios de sangue, pelo hematofagismo praticado pelos vermes adultos de ancilostomídeos (Neves *et al.*, 2010). Esta reação parece perdurar por mais tempo quando ovos de *S. mansoni* estão presentes, conferindo maior especificidade ao processo de detecção.

Os experimentos de coloração por ninidrina e emissão de luz por agente quimioluminescente não apresentaram resultados satisfatórios quando realizados com ovos e sedimento Helmintex® fixado com formaldeído 10%, porém não se sabe ainda o que promove a inibição dos reagentes quando utilizado o formaldeído 10 %. Uma alternativa seria a substituição e a padronização do agente fixador para etanol 10 %, que se mostrou eficaz nos estudos realizados.

A cada novo método diagnóstico lançado no mercado, verifica-se a desvantagem do custo-benefício ou da falta de sensibilidade em determinadas áreas. Com a urgência de técnicas diagnósticas que facilitem a detecção do parasito principalmente em áreas que passaram por tratamento anti-parasitário intensivo ou em áreas de baixa prevalência, a implementação e adequação de novas ferramentas, e modificações no processamento de métodos já desenvolvidos que busquem facilitar o diagnóstico, torna-se primordial. Neste trabalho foi estudada a inclusão de duas novas medidas de detecção na última etapa do método Helmintex®. A utilização destas duas ferramentas reduziu o tempo usual de detecção dos ovos no sedimento final, tornando o método, além de sensível, mais eficiente. A otimização de métodos existentes revela-se como uma alternativa mais vantajosa e barata, do que o desenvolvimento de novos métodos. O aprimoramento do Helmintex® pode resultar num método diagnóstico mais rápido e simples, especialmente nas áreas de baixa endemicidade da esquistossomose.