

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Ana Virgínia Matos Sá Barreto

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES  
BIOLÓGICOS E OS GRAUS DE FIBROSE  
HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Recife

2011

**Ana Virgínia Matos Sá Barreto**

**Associação entre Marcadores Biológicos e os Graus de Fibrose Hepática na  
Esquistossomose Mansônica**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-epidemiologia e Controle de Endemias

Orientadora: Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Co-orientadora: Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

Recife

2011

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

---

B273a Barreto, Ana Virgínia Matos Sá.  
Associação entre marcadores biológicos e os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica / Ana Virgínia Matos Sá Barreto. — Recife: A. V. M. S. Barreto, 2011.  
83 p.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Morais.

Co-orientadora: Sílvia Maria Lucena Montenegro.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Fibrose - diagnóstico. 3. Marcadores Biológicos. 4. Índices. I. Morais, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. III. Título.

---

CDU 616.36-004

**ANA VIRGÍNIA MATOS SÁ BARRETO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES BIOLÓGICOS E OS GRAUS DE FIBROSE  
HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 29/03/2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira  
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena  
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais  
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho a José Mario Matos Sá Barreto

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e renovação da fé, para acreditar na realização de todos os meus sonhos.

Aos meus pais e familiares pela coragem, incentivo, cumplicidade e apoio para a conclusão de mais uma etapa de minha vida.

Ao meu amigo-noivo, Glauber Barros, que sempre me ajudou a superar as dificuldades encontradas e pela dedicação e amor em todos estes momentos.

À minha orientadora, Dra. Clarice, e à minha co-orientadora, Dra. Silvia, pelos ensinamentos, estímulos e empenho durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Ana Lúcia Coutinho, Dr. Edmundo Lopes e Dr. Tibério Medeiros, do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE pelo apoio e conhecimentos gerados durante a seleção dos pacientes.

Ao, agora colega de profissão, Vinícius Martins pela participação e ajuda na obtenção deste trabalho.

À minha grande amiga, Pietra Lemos, pela força e carinho, os quais foram decisivos para fazer o mestrado.

À técnica Cícera pelo suporte na coleta dos pacientes.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública por todo apoio e amparo que me foram dados e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa a mim concedida durante o mestrado.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por toda a infra-estrutura disponibilizada para a realização desta dissertação.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas pelo espaço cedido para a realização da dosagem dos marcadores bioquímicos e plaquetas.

Ao Dr. João Roberto Maciel Martins (UNIFESP) pela ajuda na realização da dosagem do ácido hialurônico.

À George Tadeu pelos suporte na análise estatística.

Ao Departamento de Parasitologia da UPE, em especial à Dra. Patrícia Moura e Guilherme Messias, pelo apoio e confiança durante a realização do Estágio de Docência.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus,  
daqueles que são chamados segundo o seu propósito”.

Romanos 8:28

BARRETO, Ana Virgínia Matos Sá. Associação entre marcadores biológicos e os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

## RESUMO

A fibrose periportal (FPP) é a maior consequência patológica da infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Seu diagnóstico é realizado através da ultrassonografia (USG), mas por apresentar algumas limitações, marcadores biológicos têm sido propostos para diagnosticar a fibrose. Porém, ainda não foi proposto um índice biológico para a detecção da fibrose na esquistossomose. Com o objetivo de estabelecer uma associação entre marcadores biológicos com a FPP, este estudo se propôs a construir um índice biológico (IB) para prever a fibrose em pacientes esquistossomóticos. Para isso, foram selecionados 120 pacientes e aferidos os marcadores: bioquímicos [transaminases (AST e ALT),  $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina (FA) e ácido hialurônico (AH)], citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-13] e número de plaquetas. A USG foi empregada para detectar e categorizar a fibrose usando a classificação de Niamey. Os níveis séricos dos marcadores bioquímicos e o número de plaquetas foram determinados em aparelho automatizado, com exceção do AH que foi por método imunofluorimétrico e as citocinas por ensaio imuno-enzimático. A USG revelou 20 pacientes sem FPP, 50 com FPP moderada e 50 com FPP avançada. A análise multivariada mostrou que FA e plaquetas foram os preditores de fibrose independentes, formando o IB<sup>1</sup>. E que AH e TGF- $\beta$  foram os marcadores independentes para prever a FPP avançada, formando o IB<sup>2</sup>. Os IB<sup>1</sup> e IB<sup>2</sup> apresentaram área abaixo da curva ROC de 0,828 e 0,967, respectivamente. Usando-se valores abaixo do menor ou acima do maior ponto de corte, a predição da ausência ou presença de FPP pôde ser feita em 49,2% dos pacientes. Com valor preditivo negativo (VPN) de 50% para excluir a fibrose e valor preditivo positivo (VPP) de 97,8% para definir a FPP. A predição da ausência ou presença de FPP avançada pôde ser feita em 71% dos pacientes. Com VPN de 94,7% para excluir a FPP avançada e com VPP de 97,1% para definir a fibrose avançada. Nossos resultados sugerem que os IBs têm potencial para serem utilizados no diagnóstico da presença e gravidade da FPP, após confirmação através do processo de validação.

**Palavras-chave:** esquistossomose mansoni; fibrose - diagnóstico; marcadores biológicos; índices.

BARRETO, Ana Virgínia Matos Sá. Association between biomarkers and the hepatic fibrosis degrees in schistosomiasis mansoni. 2011. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

### ABSTRACT

Periportal fibrosis (PPF) is the major pathological consequence of the *Schistosoma mansoni* infection. Its diagnosis is assessed by the ultrasound and for having limitations, biological markers have been proposed for predicting fibrosis. However, a biological index for the detection of fibrosis in schistosomiasis was not yet proposed. The aim of our study was to establish an association between biological markers with the PPF and to construct a biological index (BI) to predict fibrosis in schistosomiasis patients. We selected 120 patients and we measured the markers: biochemical [aminotransferases (AST and ALT),  $\gamma$ -glutamyl transferase, alkaline phosphatase (AP) and hyaluronic acid (HA)], cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IL-13) and platelet count. The ultrasound was used to detect and to categorize the fibrosis using the Niamey protocol. The serum levels of the biochemical markers and the platelet count were determined in automated equipment, exception the HA that it was by an immunofluorimetric method and the cytokines by commercial ELISA kits. The ultrasound showed 20 patients without PPF, 50 with moderate PPF and 50 with advanced PPF. The multivariate analysis showed that AP and platelet count were the independent predictors of fibrosis, forming the BI<sup>1</sup>, whereas HA and TGF- $\beta$  were the independent predictors of advanced PPF, forming the BI<sup>2</sup>. The area under ROCs for prediction fibrosis and advanced fibrosis were 0.828 and 0.967, respectively. Using values below of the lower or above of the higher cut-off level, the prediction of absence or presence of PPF could be made in 49,2% of patients. With 50% negative predictive value (NPV) for the exclusion of fibrosis and 97,8% positive predictive value (PPV) to define the PPF. The prediction of absence or presence of advanced PPF could be made in 71% of patients. With 94.7% NPV for the exclusion of advanced PPF and 97.1% PPV to define advanced fibrosis. Our results suggest that the BIs have potential to be used in the diagnosis of the presence and severity of the PPF, after confirmation through the validation process.

**Key words:** schistosomiasis mansoni; fibrosis - diagnosis; biomarkers; index.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no território brasileiro (2004).....	18
<b>Figura 2</b>	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	21
<b>Figura 3</b>	Processo fibrogênico na esquistossomose mansônica.....	31
<b>Quadro 1</b>	Ação dos marcadores biológicos no processo fibrogênico na esquistossomose mansônica.....	35
<b>Figura 4</b>	Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Nيامey.....	41
<b>Figura 5</b>	Níveis séricos de transaminases (A – Alanina Aminotransferase; B – Aspartato Aminotransferase) em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.....	50
<b>Figura 6</b>	Relação entre os níveis séricos das enzimas colestáticas (A – gama-Glutamil transferase; B – Fosfatase alcalina) com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.....	51
<b>Figura 7</b>	Concentração sérica do ácido hialurônico em relação aos padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.....	51
<b>Figura 8</b>	Relação entre os níveis séricos de citocinas (A – IFN- $\gamma$ ; B – IL-13; C – TNF- $\alpha$ ; D – TGF- $\beta$ ) com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.....	54
<b>Figura 9</b>	Relação entre o número de plaquetas com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos.....	55
<b>Figura 10</b>	Comparação entre as Curvas ROC dos índices biológicos (A – IB <sup>1</sup> ; B – IB <sup>2</sup> ) com seus respectivos marcadores individuais.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos 120 pacientes esquistossomóticos por idade e sexo.....	47
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos pacientes esquistossomóticos quanto à localização do banho de rio e procedência atual.....	48
<b>Tabela 3</b>	Características dos pacientes em relação aos padrões de fibrose periportal (FPP).....	49
<b>Tabela 4</b>	Desempenho dos marcadores bioquímicos como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica.....	52
<b>Tabela 5</b>	Desempenho das citocinas TNF- $\alpha$ e TGF- $\beta$ como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica.....	54
<b>Tabela 6</b>	Desempenho das plaquetas como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica.....	56
<b>Tabela 7</b>	Correlação entre os índices biológicos com seus respectivos marcadores.....	58
<b>Tabela 8</b>	Desempenho dos índices biológicos frente ao diagnóstico da fibrose periportal através da ultrassonografia.....	59
<b>Tabela 9</b>	Desempenho dos índices biológicos em prever a fibrose hepática na esquistossomose mansônica.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAC</b>	Área abaixo da curva
<b>AGR</b>	Agreste
<b>AH</b>	Ácido hialurônico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b><i>B. straminea</i></b>	<i>Biomphalaria straminea</i>
<b><i>B. teganophila</i></b>	<i>Biomphalaria teganophila</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster differentiaton</i>
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>CPqAM</b>	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido elitenodicemino tetra-acético
<b>EGC</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>EHE</b>	Esquistossomose hepatoesplênica
<b>EHI</b>	Esquistossomose hepatointestinal
<b>EI</b>	Esquistossomose intestinal
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPM</b>	Escola Paulista de Medicina
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>Farmaguinhos</b>	Instituto de Tecnologia em Fármacos
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FPP A</b>	Fibrose periportal ausente
<b>FPP B</b>	Fibrose periportal duvidosa
<b>FPP C</b>	Fibrose periportal periférica
<b>FPP D</b>	Fibrose periportal central
<b>FPP E</b>	Fibrose periportal avançada
<b>FPP F</b>	Fibrose periportal muito avançada

<b><math>\gamma</math>-GT</b>	Gama-Glutamil transferase
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HC</b>	Hospital das Clínicas
<b>IB</b>	Índice Biológico
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon-gamma</i>
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LIKA</b>	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
<b>LR</b>	<i>Likelihood ratio</i>
<b>LSN</b>	Limite Superior de Normalidade
<b>MPs</b>	Metaloproteinases
<b>NESC</b>	Departamento de Saúde Coletiva
<b>n</b>	Tamanho da amostra
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>Papes</b>	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares Periféricas
<b>PDGF</b>	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
<b>PV</b>	Valor preditivo
<b>RMR</b>	Região Metropolitana do Recife
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<b><i>S. mansoni</i></b>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único Saúde
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator Transformador do Crescimento-beta
<b>Th</b>	Linfócito T <i>helper</i>
<b>TIMPs</b>	Inibidores Tissulares de Metaloproteinases
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral-alpha
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>USG</b>	Ultrassonografia
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>ZM</b>	Zona da Mata

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA</b> .....	17
2.1 Epidemiologia.....	17
2.2 Ciclo evolutivo e transmissão.....	19
2.3 Manifestações clínicas.....	21
2.4 Diagnóstico.....	24
2.5 Tratamento.....	26
2.6 Imunopatologia.....	27
2.7 Fibrose hepática na esquistossomose.....	30
2.8 Marcadores biológicos da fibrose hepática.....	32
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	37
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	38
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	39
6.1 Objetivo geral.....	39
6.2 Objetivos específicos.....	39
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	40
7.1 Cálculo da amostra e Desenho de estudo.....	40
7.2 Seleção de pacientes.....	40
7.3 Avaliação do grau de fibrose periportal.....	41
7.4 Avaliação dos marcadores biológicos.....	42
7.4.1 <i>Dosagem dos marcadores bioquímicos</i> .....	42
7.4.2 <i>Dosagem de citocinas</i> .....	43
7.4.3 <i>Dosagem de plaquetas</i> .....	44
7.5 Análise estatística e Índice biológico.....	44
<b>8 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	46
<b>9 RESULTADOS</b> .....	47
9.1 Caracterização da amostra.....	47
9.2 Relação entre níveis de marcadores bioquímicos com os graus de fibrose periportal.....	49

9.3 Relação entre níveis de citocinas com os graus de fibrose periportal.....	53
9.4 Relação entre níveis o número de plaquetas com os graus de fibrose periportal.....	55
9.5 Índice biológico.....	56
<b>10 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>11 CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>12 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Esquistossomótico.....	79
<b>APÊNDICE B</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo Saudável.....	80
<b>APÊNDICE C</b> – Questionário de Pesquisa.....	81
<b>ANEXO A</b> – Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM/FIOCRUZ.....	83

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, constituindo-se em um grande problema de saúde pública. A patologia da doença é provocada por uma resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro contra os ovos do *Schistosoma mansoni* presos nos sinusóides hepáticos. Este processo pode levar ao acúmulo e deposição de tecido fibrótico, estabelecendo a fibrose periportal (FPP) e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hipertensão portal. As complicações desse quadro, como o sangramento digestivo alto devido à ruptura das varizes esofagianas, são responsáveis pela mortalidade associada à esquistossomose (ABATH et al., 2006; GRYSEELS et al., 2006; MANZELLA et al., 2008).

A FPP é uma consequência típica da inflamação e lesão tecidual crônica provocada pela embolização dos ovos de *S. mansoni* que atingem o fígado, provenientes das veias mesentéricas. O processo fibroso tem início quando as células estreladas hepáticas são ativadas e alteram seu fenótipo para miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos com o acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágenos (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009), ao longo das ramificações do sistema porta (HENRI et al., 2002), resultando de um desequilíbrio entre a produção e degradação da matriz (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

Métodos de imagem, como a ultrassonografia (USG), tornaram-se uma importante ferramenta na avaliação da morbidade devido à infecção pelo *S. mansoni*, permitindo grandes avanços na identificação das alterações hepáticas, esplênicas e do sistema porta (MACHADO et al., 2002). Apesar da ampla utilização da USG no diagnóstico e acompanhamento das formas clínicas da esquistossomose, seu uso apresenta algumas limitações, tais como: baixa sensibilidade nas formas clínicas iniciais da doença; necessidade de um examinador treinado; não está acessível em todos os centros de saúde, resultando no surgimento de um importante campo de pesquisa na tentativa de desenvolver métodos não invasivos através de marcadores biológicos séricos envolvidos no processo fibrogênico para avaliar o grau/estágio da fibrose hepática na esquistossomose humana (BUCHARD et al., 1998; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; MARINHO et al., 2010; MORAIS et al., 2010; RICARD-BLUM et al., 1999).

A avaliação da presença e gravidade da fibrose hepática é de primordial importância na determinação das estratégias de tratamento, acompanhamento da resposta do paciente à terapia adotada, prognóstico, monitoramento das formas clínicas e do risco potencial para o

desenvolvimento de complicações em pacientes com doença hepática crônica, como a esquistossomose mansônica (THULUVATH et al., 2005).

Diferentes marcadores biológicos têm sido associados com o desenvolvimento e regulação da fibrose hepática, sendo alvo de muitos estudos para propor um teste não invasivo na avaliação do grau de fibrose, usando um marcador isoladamente ou em combinação (índice biológico). Apesar da existência e aplicação de índices biológicos em outras doenças com desenvolvimento de fibrose hepática, como na hepatite C, ainda não foi proposto ou aplicado um índice para a avaliação da fibrose na esquistossomose. Diante disso, o presente projeto estudou marcadores biológicos para avaliar a associação entre a fibrose hepática na esquistossomose mansônica com os níveis séricos de marcadores biológicos, na tentativa de desenvolver um índice biológico para analisar a fibrose periportal. O objetivo é contribuir para um maior conhecimento do processo fibrogênico na esquistossomose, monitoramento, identificação das formas graves e prognóstico da doença nesses pacientes.

## 2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

### 2.1 Epidemiologia

A esquistossomose mansônica é, ainda hoje, considerada como uma das mais importantes infecções helmínticas em saúde pública e a segunda mais prevalente doença parasitária humana, ficando atrás apenas dos casos de malária (BICHLER et al., 2001), devido à sua cronicidade, ampla distribuição geográfica e impacto na economia, pelas repercussões sobre a atividade da população infectada (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005).

É uma doença milenar que afeta mais de 200 milhões de indivíduos em áreas rurais e peri-urbanas, distribuídos em 74 países da África, do leste Mediterrâneo, do Caribe e da América do Sul. Entre as pessoas infectadas, 50 a 60%, mais de 100 milhões, apresentam manifestações da doença e 10% desenvolvem a forma grave da esquistossomose (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

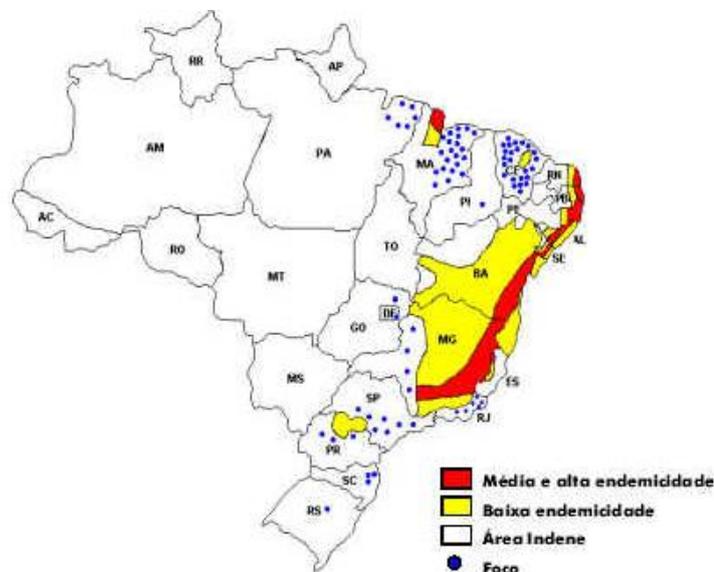
O Brasil é um país que apresenta uma grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na variedade de parasitas encontrados (SCHANACK et al., 2003), onde a esquistossomose mansônica é uma das mais importantes endemias parasitárias (DOMINGUES; BARRETO, 2001). O surgimento da doença no país se deu, provavelmente, durante o tráfico de escravos africanos, os quais eram portadores do parasita, o *Schistosoma mansoni*. Fatores como a presença de hospedeiros intermediários suscetíveis (caramujos do gênero *Biomphalaria*), clima favorável (tropical), a falta de saneamento básico, o comportamento populacional inadequado e os movimentos migratórios favoreceram para o estabelecimento e expansão da doença no território brasileiro (MELO; COELHO, 2010).

Apesar dos esforços para o controle da doença, o Brasil é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados, estimando-se 4,6% da população, ou seja, aproximadamente 6 a 7 milhões de brasileiros infectados pelo parasita (KATZ; PEIXOTO, 2000). Atualmente no país a doença ocorre em 19 das 27 unidades federativas, em uma área ao longo do litoral, desde o Rio Grande do Norte até a Bahia, na região Nordeste, alcançando o interior do Espírito Santo e Minas Gerais, no Sudeste e também está presente, de forma localizada, em outros estados de todas as regiões do país (Figura 1) (BRASIL, 2007).

Embora a mortalidade por esquistossomose no Brasil tenha reduzido em aproximadamente 62,9% entre os anos de 1980 a 2003 (FERREIRA; SILVA, 2007), dados da

literatura mostram que esta doença continua sendo um sério problema de saúde pública (KATZ; ALMEIDA, 2003). Alguns estudos regionais mostram uma situação preocupante e ainda longe da erradicação do parasito ou da sua transmissão, ocasionando sérias consequências para o desenvolvimento sócio-econômico do país (COURA; AMARAL, 2004; FERREIRA; SILVA, 2007; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005).

A maioria dos casos da doença ocorre na região Nordeste, onde os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia apresentam as maiores prevalências do país (COURA; AMARAL, 2004). Pernambuco é o estado mais afetado da região com cerca de 15% da população infectada, onde a endemia é considerada uma das principais causas de mortalidade por doença transmissível (COURA; AMARAL, 2004). Dados do Ministério da Saúde mostram que no ano de 2005 a prevalência da doença no estado foi de 9,7% com 151.432 pessoas examinadas. Entre o período de 2001-2005, a média anual de internações foi de 233,8 e dos 519 óbitos por esquistossomose registrados em 2004, no Brasil, Pernambuco foi responsável por 38,9% (BRASIL, 2007). No estado, a área endêmica ocupa 79 dos 167 municípios, dos quais 55 estão localizados na Região Metropolitana e Zona da Mata e 24 no Agreste pernambucano (FAVRE, 2001).



**Figura 1** - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no território brasileiro (2004)  
Fonte: Brasil (2007).

Em Pernambuco, a esquistossomose é historicamente endêmica na zona rural, caracterizando-se sob a forma crônica (BARBOSA et al., 2006; FAVRE et al., 2006). Entretanto, os constantes movimentos migratórios de indivíduos infectados provenientes de

áreas endêmicas para áreas indenes aliado a ocupação desordenada e modificação dos espaços urbanos tem contribuído para a expansão da esquistossomose com o estabelecimento de novos focos. Dessa maneira vem ocorrendo no estado uma mudança no perfil epidemiológico da doença em que casos de infecção aguda têm sido detectados em áreas do litoral pernambucano, acometendo em sua maioria indivíduos jovens e adultos que visitam essa região e se expõem à infecção (BARBOSA et al., 2010). Destaca-se a repercussão social e econômica que esta mudança representa, considerando que essas áreas são importantes para o turismo do estado.

Embora o diagnóstico e tratamento da esquistossomose sejam relativamente simples, o controle da doença é uma das tarefas mais difíceis dos serviços de saúde pública em razão de: ampla difusão dos hospedeiros intermediários; mecanismos de escape com relação à existência dos métodos de controle atuais; frequência do contato humano com a água em atividades agrícolas, domésticas e/ou lazer; dinâmicas próprias de cada microfoco de transmissão; alto custo das obras de engenharia sanitária que garantam abastecimento de água adequado para as residências e eliminação dos dejetos, impedindo, assim, a contaminação dos recursos hídricos. Além disso, existe ainda: as limitações do tratamento individual e em massa; falta de abordagem preventiva associada à curativa na organização dos serviços; e a inexistência de uma vacina capaz de prevenir a doença (COURA; AMARAL, 2004; MELO; COELHO, 2010; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Diante disso, é preciso que a investigação epidemiológica assuma a complexidade da endemia compreendendo a essência social do processo saúde/doença e a historicidade dos seus determinantes.

## 2.2 Ciclo evolutivo e transmissão

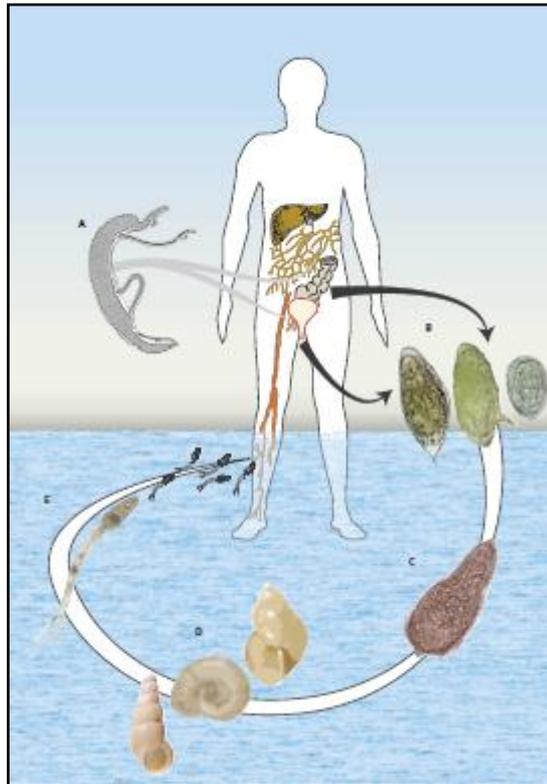
O *Schistosoma mansoni* é um platelminto da classe *Trematoda*, pertencente à família *Schistosomatidae*, que apresenta sexos separados e dimorfismo sexual (MELO; COELHO, 2010). O ciclo de vida do *S. mansoni* é complexo com várias fases evolutivas e heteroxeno, o qual passa por duas fases: uma no hospedeiro definitivo/homem e outra no hospedeiro intermediário/caramujo (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O ciclo biológico (Figura 2) deste parasita inicia-se quando indivíduos infectados pelo *S. mansoni* eliminam seus ovos pelas fezes. Em locais onde não há rede adequada de esgotos, as fezes são lançadas indevidamente em rios e lagos. E em contato com água doce e

estimulado por fatores como temperaturas mais altas, luz intensa e oxigenação da água, os ovos eclodem e liberam uma larva ciliada denominada de miracídio. Estas nadam ativamente e guiadas pela luminosidade e estímulos químicos penetram em caramujos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. teganophila* (BRASIL, 2007). Dentro do hospedeiro intermediário, o miracídio multiplica-se, sofre uma reorganização celular e transforma-se em esporocistos, os quais continuam a multiplicar e posteriormente se transformam em larvas infectantes, as cercárias. Após quatro a seis semanas, as cercárias saem do caramujo e ficam livres no meio aquático, deslocando-se ativamente, podendo penetrar em um hospedeiro definitivo, o homem, que esteja em contato com esse meio (GRYSEELS et al., 2006; MELO; COELHO, 2010).

O contato do homem com águas contaminadas com as larvas infectantes do *S. mansoni*, devido a atividades domésticas (lavagem de roupas e louças), de lazer (banhos em coleções hídricas) ou por atividades profissionais (agrícolas) é a maneira pela qual ocorre a transmissão da esquistossomose (BRASIL, 2007).

Após a penetração das cercárias através da pele ou mucosa do homem, estas se transformam em esquistossômulos, os quais migram pelo tecido subcutâneo e, ao penetrarem num vaso, são levados passivamente até o coração direito, pulmões, veias pulmonares, coração esquerdo e se dirigem para o sistema porta-intra-hepático. Uma vez no sistema porta, os esquistossômulos se desenvolvem e transformam-se em vermes adultos (macho e fêmea) num período de aproximadamente 30 dias, os quais atingem a maturidade sexual, acasalam-se e migram, contra a corrente sanguínea, para as veias mesentéricas inferiores, onde a fêmea inicia a oviposição. Os ovos podem atravessar a mucosa, alcançar a luz intestinal e, posteriormente, serem eliminados juntos com as fezes do hospedeiro infectado, iniciando, assim, um novo ciclo biológico do parasita e de transmissão da doença ou ficar presos e serem depositados no fígado e intestino. Os primeiros ovos são vistos nas fezes cerca de 45 a 50 dias após a infecção do hospedeiro (MELO; COELHO, 2010).



**Figura 2** – Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*.  
Fonte: Gryseels et al. (2006).

**Nota:** A – Vermes adultos acasalados; B – Ovos (esquerda para direita: *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*), C – Miracídio; D – Hospedeiro intermediário (esquerda para direita: *Oncomelania*, *Biomphalaria* e *Bulinus*); E – Cercária.

### 2.3 Manifestações clínicas

Na esquistossomose mansônica a evolução clínica pode variar desde formas assintomáticas até as extremamente graves. A doença se desenvolve em duas fases, uma aguda e uma crônica, correspondendo ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro (BRASIL, 2007).

O surgimento de lesões e das formas clínicas da esquistossomose depende de fatores relacionados ao parasito como: cepa, fase evolutiva e intensidade da infecção; fatores intrínsecos do indivíduo: idade, estado nutricional, background genético e a resposta imunológica; como também a carga parasitária adquirida e a frequência de exposições (KATZ; ALMEIDA, 2003; MELO; COELHO, 2010).

A fase aguda é caracterizada pela dermatite cercariana e pela febre de Katayama (GRYSEELS et al., 2006; PORDEUS et al., 2008). A dermatite cercariana ocorre após a penetração das cercárias no hospedeiro e pode provocar um quadro de dermatite

urticariforme, com micropápulas eritematosas e pruriginosas, que pode durar até cinco dias após a infecção (GRYSEELS et al., 2006; MELO; COELHO, 2010). A febre de Katayama é em decorrência da migração das formas imaturas do parasito, os esquistossômulos, ocorrendo em algumas semanas após a infecção. É caracterizada por febre, fadiga, mialgia, cefaléia, indisposição e tosse seca. A maioria dos pacientes recupera-se espontaneamente após 2 a 10 semanas, mas alguns podem desenvolver uma doença persistente e mais complicada com perda de peso acentuada, manifestações pulmonares, diarreia, dor abdominal difusa e vômitos. Ao exame físico, o paciente pode apresentar leve aumento do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia) e ao exame laboratorial, uma eosinofilia (DA SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005).

Os sintomas clínicos da fase aguda raramente ocorrem em populações de áreas endêmicas, mas é comum entre indivíduos, como visitantes e emigrantes, que se expõem pela primeira vez ao estágio infectante (cercárias) do parasito em coleções hídricas contaminadas (MELTZER et al., 2006).

A fase aguda dura em torno de um a dois meses e seus sintomas desaparecem através de tratamento específico. Mas em indivíduos que não foram tratados, a doença pode evoluir para a fase crônica, com sinais de progressão da doença para diversos órgãos e com níveis extremos de gravidade (BRASIL, 2007). Essa fase é a principal causa da morbidade em regiões endêmicas e pode ser dividida em três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, sendo a última forma subdividida em compensada e descompensada (REY, 2001).

A esquistossomose intestinal (EI) é a forma mais encontrada nas regiões endêmicas, responsável por 90% dos casos da doença (PORDEUS et al., 2008). Porém, pode apresentar-se assintomática ou com sintomas discretos, enquanto a carga parasitária for baixa e o acúmulo de ovos do parasito nos tecidos for pequeno. É caracterizada por dor ou desconforto abdominal, perda de apetite e diarreias repetidas que podem ser mucossanguinolentas (BURKE et al., 2009; GRYSEELS et al., 2006). As manifestações clínicas da esquistossomose hepatointestinal (EHI) são muito semelhante as da EI, entretanto ocorre um maior acometimento hepático, com o fígado apresentando-se aumentado de volume (hepatomegalia) e bastante doloroso à palpação. E nos casos mais avançados dessa forma clínica, pode-se observar a presença de tecido fibrótico nos espaços intra-hepáticos do sistema porta (CHIAVAROLI; GRIMA; GRIMA, 2008; MELO; COELHO, 2010).

Na infecção pelo *S. mansoni*, o fígado é o principal local afetado, pois logo após a oviposição pelas fêmeas nas veias mesentéricas, os ovos são carregados pela circulação

sanguínea para o interior do órgão. Alguns ovos ficam presos nos pequenos vasos do fígado, induzindo uma vigorosa resposta imune com a formação de granulomas e, conseqüentemente, o surgimento de alterações hepáticas típicas. Devido à contínua oviposição e o acúmulo da formação de novos granulomas em torno desses ovos, as lesões hepáticas se tornam mais graves (PEARCE; MacDONALD, 2002). A infecção crônica e o processo inflamatório granulomatoso conduzem ao excesso de depósito de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular nas ramificações intra-hepáticas da veia porta, causando a fibrose periportal, a qual é considerada como sinal patognomônico da esquistossomose (MACHADO et al., 2002; REY, 2001).

As conseqüências mais graves da infecção pelo *S. mansoni* são o resultado de um aumento na pressão sanguínea no sistema porta, porque o fígado se torna fibrótico. Com o evoluir da doença, a FPP progride, congestionando o fluxo sanguíneo da veia intra-hepática portal, o que contribui para o desenvolvimento da esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (MANZELLA et al., 2008). Esta forma clínica da doença é a mais importante complicação crônica, representando o indicador de maior gravidade, principalmente em áreas endêmicas que mostram alta prevalência e piores condições sócio-econômicas (CLEVA et al., 2004).

Em um estudo realizado por Mesquita et al. (2004) no estado de Pernambuco, os autores verificaram que a EHE apresenta, nas regiões endêmicas, prevalência de 2 a 7%. A apresentação clínica é classificada em quatro estágios: precoce, moderado, tardio ou terminal. Os primeiros dois estágios são considerados compensados e caracteriza-se pela presença de hepatoesplenomegalia. As lesões perivasculares intra-hepáticas são em quantidade suficiente para gerar transtornos na circulação portal, com certo grau de hipertensão que provoca congestão passiva do baço. A hipertensão portal é a manifestação mais séria da doença e ocorre em 5 a 10% dos pacientes. O baço aumenta de volume, em grande parte devido à congestão venosa do ramo esplênico (veia esplênica do sistema porta), bem como à hiperplasia das células do sistema macrófago-linfocitário (REY, 2001). Nessa fase, inicia-se a formação de circulação colateral e de varizes no esôfago, com o comprometimento do estado geral do paciente (BRASIL, 2007).

Os últimos estágios (tardio e terminal) são definidos como descompensados, sendo responsáveis pela mortalidade por essa causa específica. Caracteriza-se por fígado volumoso ou já contraído pela presença de fibrose periportal avançada, elevação do grau de hipertensão portal e esplenomegalia acentuada (BRASIL, 2007). Em muitos pacientes ocorre anemia, leucopenia e plaquetopenia, que podem apresentar-se associadas ou não, sendo atribuídas ao hiperesplenismo (PETROIANU; OLIVEIRA; ALBERTI, 2004). Além disso, outros quadros

clínicos são evidenciados, como desnutrição, ascite (acúmulo de líquido na cavidade peritoneal), aumento da formação de circulação colateral e varizes gastroesofágicas, as quais podem romper e causar hemorragia digestiva alta, representando a causa usual de óbitos pela esquistossomose (ALVES Jr. et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; MACHADO et al., 2002; MANZELLA et al., 2008).

#### 2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da esquistossomose pode ser feito através do exame clínico-epidemiológico e laboratorial. Os sinais e sintomas característicos da doença podem sugerir o seu diagnóstico clínico, juntamente com os dados epidemiológicos do paciente, como histórico de exposição (contato com águas que contenham caramujos) e ser procedente de uma área endêmica. Entretanto, a esquistossomose pode ser confundida com outras doenças em função das diferentes manifestações que ocorrem durante a sua evolução, tendo o diagnóstico confirmado através de exames laboratoriais (BRASIL, 2007).

Para o diagnóstico laboratorial pode ser realizado métodos parasitológicos, imunológicos e de imagem. O encontro dos ovos do parasito nas fezes do paciente através do exame parasitológico, ainda é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. Os ovos do *S. mansoni* são fáceis de detectar e identificar pela microscopia devido ao seu tamanho e à presença de um espículo lateral típico (GRYSEELS et al., 2006). Quanto ao método utilizado, a OMS recomenda o Kato-Katz, por ser o exame parasitológico de fezes mais sensível, rápido e de fácil execução, além de ser o mais preciso qualitativa e quantitativamente, permitindo, assim, avaliar a intensidade do parasitismo (KATZ; ALMEIDA, 2003). A biópsia retal ou hepática são métodos auxiliares indicados em casos de exame parasitológico de fezes negativo ou em condições muito especiais, entretanto a biópsia hepática, para o diagnóstico exclusivo da esquistossomose, não deve ser recomendada (MELO; COELHO, 2010).

Os métodos imunológicos verificam a resposta imunológica do hospedeiro contra a presença do parasito em seu organismo. Estes testes possuem boa sensibilidade, mas são de pouco valor no diagnóstico por ocorrer reações cruzadas com outras helmintoses, não se correlacionarem com a intensidade da infecção, permanecerem positivos após a cura do paciente e pela dificuldade de execução. Mais podem ser importantes para o diagnóstico nos

viajantes, emigrantes e pessoas expostas ocasionalmente. Entre as técnicas sorológicas mais utilizadas estão o ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), a imunofluorescência indireta e a reação de hemaglutinação indireta (GRYSEELS et al., 2006).

Métodos de imagem, como a ultrassonografia (USG), ressonância magnética, tomografia computadorizada, cintilografia, esplenoportografia e elastografia são utilizados para detecção das lesões provocadas pelo *S. mansoni* particularmente no fígado e sistema porta. Dentre eles, a USG é o mais utilizado por ser não invasivo, simples de ser realizado, não ter as desvantagens de irradiação, ter, comparativamente, um custo mais baixo e maior aplicabilidade em estudos de campo em relação aos outros métodos de imagem (DOMINGUES, 2008). A USG constitui-se em um grande progresso para o diagnóstico clínico, principalmente na fase crônica da doença, e vem sendo muito utilizada nos principais centros de saúde do nosso país (MELO; COELHO, 2010). Através da USG é possível analisar: a superfície hepática, o tamanho dos lobos direito e esquerdo do fígado (indicando presença ou ausência de hepatomegalia), o volume do baço (esplenomegalia), os diâmetros das veias porta e esplênica, o estágio da fibrose periportal e os sinais de hipertensão portal (circulação colateral e ascite), permitindo avaliar a extensão, evolução e possível regressão da doença após seu tratamento (ESPÍRITO SANTO et al., 2008; MACHADO et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

A avaliação ultrassonográfica da fibrose periportal em pacientes esquistossomóticos é composta por uma graduação subjetiva (análise qualitativa, comparando-se o fígado examinado com padrões de acometimento pela fibrose) e objetiva (análise quantitativa, medindo-se a espessura da fibrose periportal). A análise qualitativa é obtida através da classificação de Niamey (RICHTER et al., 2001), a qual considera seis padrões de fibrose periportal denominados: A (ausência de fibrose); B (duvidosa); C (periférica); D (central); E (avançada) e F (muito avançada). Já a análise quantitativa é realizada de acordo com a classificação do Cairo (CAIRO WORKING GROUP, 1992), na qual a fibrose periportal é ordenada em três graus através da média de espessura do tecido fibrótico encontrado: grau I – leve ( $> 3$  a  $< 5$  mm); grau II – moderada ( $> 5$  a  $< 7$  mm); grau III – severa ( $> 7$  mm).

Apesar da ampla utilização da USG no diagnóstico e acompanhamento da esquistossomose, seu uso apresenta algumas limitações: baixa sensibilidade nas formas iniciais da doença; necessidade de um examinador treinado para o diagnóstico da doença; variação inter-examinador, sendo considerado um procedimento examinador-dependente; não está acessível em todos os centros, principalmente nos menores que estão situados em áreas urbanas e rurais endêmicas (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007).

Como resultado dessas limitações, estudos sugeriram abrindo um importante campo de pesquisa na tentativa de desenvolver métodos diagnósticos não invasivos através de marcadores biológicos séricos (bioquímicos e citocinas envolvidas na regulação da fibrose) com potencial para prover um método sensível e custo efetivo na avaliação do grau/estágio da fibrose hepática na esquistossomose humana (BUCHARD et al., 1998; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; MARINHO et al., 2010; MORAIS et al., 2010; RICARD-BLUM et al., 1999).

## 2.5 Tratamento

O tratamento da esquistossomose é realizado através de antiparasitários com substâncias químicas tóxicas ao parasito. Atualmente o tratamento é realizado com medicamentos disponíveis no mercado brasileiro: praziquantel e oxamniquina.

O praziquantel é uma droga que atua contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem. Pertence ao grupo químico isoquinolino-pirazino, atuando, principalmente, no tegumento do parasito. Essa lesão provocada pela ação da droga expõe antígenos-alvo da resposta imune específica para o processo de eliminação dos vermes. O esquema terapêutico que apresenta melhor eficácia é a dose oral diária de 60 mg/kg para crianças até 15 anos e 50 mg/kg para adultos, ambos em dose única. Os efeitos colaterais são pouco intensos e passageiros, caracterizados por dor abdominal, cefaléia e sonolência, principalmente (GRYSEELS et al., 2006; MELO; COELHO, 2010).

A oxamniquina pertence ao grupo químico aminoalquiltolueno e seu mecanismo de ação se baseia em efeito anticolinérgico como também na inibição da síntese de ácidos nucleicos. Entre o gênero *Schistosoma*, atua somente nas formas maduras da espécie *S. mansoni*. Os machos são mais afetados pelo medicamento que as fêmeas, mas, mesmo assim, as que sobrevivem ao tratamento não conseguem mais realizar a oviposição, interrompendo a continuidade da doença. Como 2ª escolha, oxamniquina, é administrada em dose oral única em adultos (15 mg/kg) e em crianças é dividida em duas doses diárias orais de 10 mg/kg, 1 hora após as refeições. Pode provocar alguns efeitos colaterais como: alucinações, tonturas, excitação e mudanças de comportamento (MELO; COELHO, 2010).

Tanto o praziquantel como a oxamniquina são tolerados e de baixa toxicidade e a eficácia do tratamento gira em torno de 80% dos casos, em adultos e 70% em crianças de até 15 anos. Atualmente, no Brasil, prefere-se o praziquantel por apresentar menor custo e

também por ser fabricado em Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz (KATZ; ALMEIDA, 2003). O tratamento quimioterápico deve ser realizado em todos os casos confirmados (pacientes com a presença de ovos viáveis nas fezes ou na mucosa retal). A importância do tratamento reside não só no fato de curar a doença ou diminuir a carga parasitária dos pacientes, como também impedir sua evolução para as formas graves (BRASIL, 2007).

## 2.6 Imunopatologia

A patologia da esquistossomose mansônica é desencadeada principalmente por uma resposta imunológica (inflamatória granulomatosa) que ocorre em torno dos ovos vivos do parasito retidos nos tecidos do hospedeiro. A resposta granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade tipo tardia mediada por células T CD4<sup>+</sup> e desenvolve-se em cinco estágios patológicos: reação fraca, a qual é caracterizada pelo acúmulo de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor do ovo recém depositado; fase exudativa com a formação de um microabcesso neutrofilico; fase exudativa-produtiva, onde ocorre o amadurecimento do granuloma com o aparecimento de histiócitos e células epitelióides que gradualmente substitui a zona leucocitária e fibrócitos na zona periférica da lesão; estágio produtivo, no qual os ovos se tornam degenerados e desintegram-se, com um maior número de fibrócitos e deposição de fibras colágenas na área lesionada; e o estágio de involução com a redução no tamanho e endurecimento do granuloma (BURKE et al., 2009).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar, principalmente, em dois tipos de células T efetoras, denominadas Th1 (as quais produzem as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (que produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). As citocinas Th1 ativam a resposta inflamatória e citotóxica, induzindo uma hipersensibilidade tipo tardia. Enquanto, as citocinas Th2 estimulam a produção de anticorpos, particularmente IgE e aumentam a proliferação de eosinófilos. Essas duas respostas são reguladas mutuamente, onde ocorre a produção simultânea de ambos os perfis de citocinas (ABATH et al., 2006; JANEWAY et al., 2007).

Fallon et al. (2000), em um estudo com camundongos deficientes na produção de IL-4 ou IL-13 ou em ambas, demonstraram que a IL-4 é responsável pelo desenvolvimento da resposta granulomatosa, induz a proliferação de linfócitos Th2 e é importante para a produção de IL-5 e IL-13. Já a IL-13 é considerada uma citocina pró-fibrótica, sendo assim, relacionada ao desenvolvimento da fibrose hepática induzida pelo *S. mansoni*. A IL-5 é importante para o

recrutamento de eosinófilos na resposta granulomatosa (REIMAN et al., 2006) e a IL-10 apresenta um papel fundamental na regulação da resposta Th1 e Th2, prevenindo o desenvolvimento de uma patologia mais grave (ABATH et al., 2006).

Estudos realizados com modelos experimentais (murinos) e em humanos infectados pelo *S. mansoni* tem caracterizado a esquistossomose como uma doença predominantemente do tipo Th2, implicando a produção deste perfil de citocinas como a causa da morbidade e de ser prejudicial ao hospedeiro (deJESUS et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2004). Entretanto, dados de um estudo com camundongos infectados sugerem que a resposta do tipo 2 é necessária para a sobrevivência do hospedeiro (FALLON et al., 2000). Ao contrário, estudos em humanos infectados para avaliar o perfil de citocinas associadas com a doença sugerem que uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1 é a causa da morbidade (HENRI et al., 2002; MORAIS et al., 2008).

Em camundongos infectados, durante as primeiras semanas de infecção, uma moderada resposta Th1 é gerada contra a migração da forma imatura do parasito. Esta resposta é caracterizada pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (PEARCE; MacDONALD, 2002; WILSON et al., 2007). Então, acredita-se que a resposta imunológica muda para uma resposta predominante do tipo Th2 no momento da oviposição, com aumento na expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A resposta Th2 alcança um pico em aproximadamente 8 semanas após a infecção e é modulada/regulada com a progressão da doença (BURKE et al., 2009).

No homem, o perfil de produção de citocinas está relacionado com as diferentes formas clínicas da esquistossomose, o que revela um estudo realizado por Morais et al. (2008). Neste estudo foi verificado que na fase aguda há uma associação na expressão de citocinas do tipo Th1 e Th2 com predominância das Th1, onde se observa níveis altos de IFN- $\gamma$  e baixo de IL-10, pois nesta fase não ocorre uma modulação da resposta imunológica. Também ocorre um aumento no número de eosinófilos e produção de IgE (CALDAS et al., 2008).

Pacientes com a forma intestinal exibem uma resposta mista Th1/Th2 com altos níveis de IL-4 em comparação a fase aguda e também sucede aumento na frequência de células T produtoras de IL-10. Os pacientes portadores da EHI reagem aos antígenos do *Schistosoma* com um perfil dominante de citocinas Th2, apresentando um aumento na produção das IL-4 e IL-5, entretanto, apresentam pouca IL-10 quando comparados com pacientes na forma EI. Em contraste, pacientes hepatoesplênicos têm uma fraca resposta Th2 associada com o aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e diminuição da expressão das citocinas IL-5 e IL-10, o que

leva ao desenvolvimento de uma resposta imunológica predominantemente pró-inflamatória (ABATH et al., 2006; BURKE et al., 2009; MORAIS et al., 2008; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2008).

Porém, baixos níveis na produção de IFN- $\gamma$  e níveis elevados das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 têm sido associados com um aumento no risco de desenvolver fibrose hepática severa na esquistossomose (ALVES-OLIVEIRA et al., 2006; deJESUS et al., 2004). Henri et al. (2002) em um trabalho realizado em uma população sudanesa mostraram que a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com fibrose periportal moderada a severa é muito mais baixa do que em culturas de indivíduos com FPP leve, enquanto que altos níveis de TNF- $\alpha$  estavam associados com a FPP moderada a severa. Esse estudo sugere, juntamente com os resultados de estudos experimentais sobre o papel de certas citocinas na regulação da fibrose hepática induzida pelo *S. mansoni*, que o IFN- $\gamma$  exerça um importante papel na proteção contra a FPP, enquanto que o TNF- $\alpha$  pode agravar a fibrose em indivíduos cronicamente infectados.

Além disso, em indivíduos nos estágios iniciais do desenvolvimento da hepatoesplenomegalia foi demonstrado uma associação do perfil de citocinas Th2 (IL-5, IL-10 e IL-13) com FPP severa. Como a doença hepatoesplênica é uma complicação crônica da doença, é concebível que mecanismos imunes sejam responsáveis para a ocorrência da fibrose no início dessa forma e precede o desenvolvimento da hepatoesplenomegalia (MAGALHÃES et al., 2004).

Em resumo, na esquistossomose murina, trabalhos têm associado o início da inflamação granulomatosa a uma resposta Th1 de curta duração. Todavia, outros estudos na literatura apontam que as alterações patológicas na esquistossomose são decorrentes de citocinas do tipo Th2 (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000), em que as IL-4, IL-5 e IL-13 contribuem para a formação do granuloma e a presença de eosinófilos nessas lesões (CHIAROMONTE et al. 2001). Entretanto, nos seres humanos, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de TNF- $\alpha$  (perfil Th1) estão associados com a presença de fibrose periportal avançada (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002).

Os achados nos diferentes estudos sugerem que não há um consenso sobre qual perfil de produção de citocinas, tipo Th1 ou Th2, é responsável pela morbidade observada na esquistossomose humana, sugerindo que o resultado da doença é influenciado pela natureza da resposta imune Th1/Th2 contra antígenos do *Schistosoma* (ABATH et al., 2006).

## 2.7 Fibrose hepática na esquistossomose

A fibrose hepática é a maior causa de morbidade e mortalidade mundialmente, e é induzida por uma variedade de fatores como o abuso de drogas e álcool, alergias crônicas e diferentes agentes infecciosos. Além disso, é o resultado do dano crônico ao fígado em conjunto com o acúmulo de elementos da matriz extracelular (ECM) (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas), o que é uma característica das doenças hepáticas crônicas (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

A ativação das células estreladas hepáticas (conhecidas também como lipócitos a células de Ito) é o evento dominante na fibrogênese e consiste na alteração fenotípica dessas células em fibroblastos e em miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos (ANTHONY et al., 2010; FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009). No fígado normal, as células estreladas hepáticas residem no espaço de Disse, armazenam gordura e grânulos de vitamina A e compreendem aproximadamente 15% do total de células residentes no fígado. Constituem as principais estruturas responsáveis pela homeostase do órgão e desempenham um papel central na resposta à lesão hepática. Com a lesão, essas células são ativadas e ocorre a alteração fenotípica.

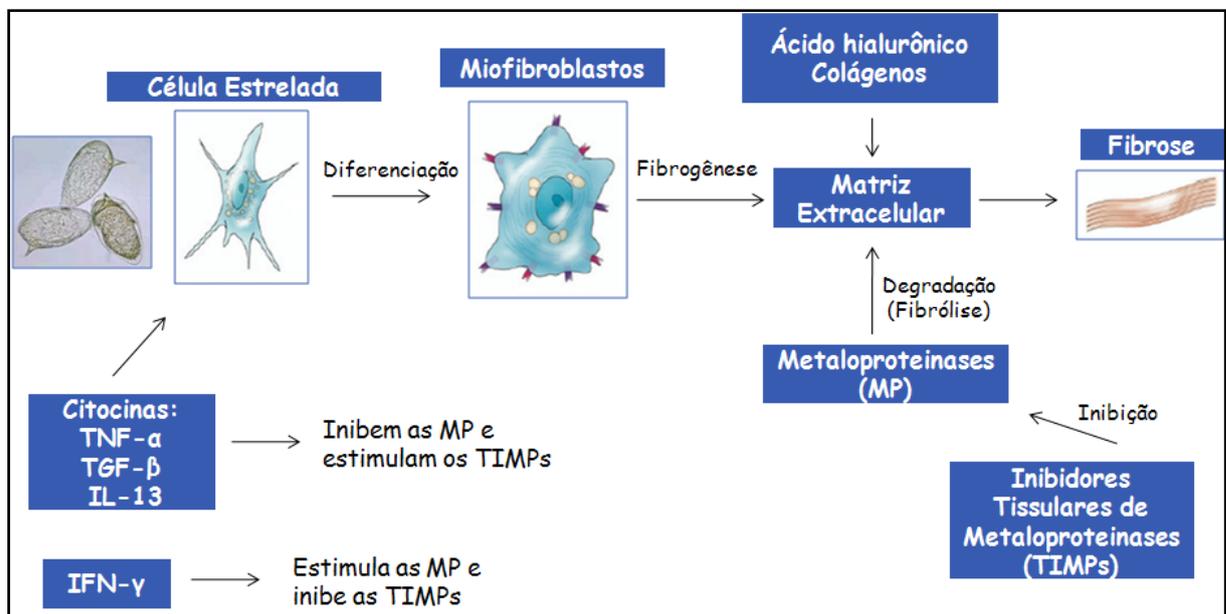
A ativação das células estreladas hepáticas revela-se um processo complexo e organizado, composto de três etapas denominadas: iniciação, perpetuação e resolução. A iniciação é caracterizada por alterações rápidas e fenotípicas celulares, tornando-as responsivas às citocinas e a outros estímulos locais. As respostas celulares que se seguem à iniciação são denominadas perpetuação (continuação dinâmica do processo fibrótico) e consistem nos eventos celulares que amplificam o fenótipo ativado através da expressão e responsividade das citocinas. A resolução representa a etapa essencial da reversibilidade da fibrose (FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

As células estreladas hepáticas são responsáveis pela formação da ECM, que é importante para manter a função diferenciada de todas as células residentes no fígado. Porém, com o processo fibrótico, ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM hepática. Nos estágios avançados, o fígado contém aproximadamente seis vezes mais ECM do que o fígado normal, incluindo colágenos (I, III e IV), fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN, 2008).

As células estreladas hepáticas secretam enzimas chaves na fisiopatologia da fibrose, as metaloproteinases (MPs), que promovem a degradação da ECM. As MPs são reguladas

pelos inibidores tissulares de metaloproteinasas (TIMPs), gerando um balanço entre as ações de síntese (fibrogênese) e degradação (fibrólise) da ECM, sendo este mecanismo importante para o sucesso do processo de reparação de danos causados ao tecido hepático (WYNN, 2007). Contudo, a permanência do agente agressor no fígado resulta em uma maior deposição dos componentes da ECM devido à diminuição da sua degradação pelas MPs ocasionada pela super expressão dos TIMPs (BATALLER; BRENNER, 2005). Esse desequilíbrio em conjunto com o acúmulo dos ECM distorcem a arquitetura hepática, levando à formação de cicatrizes fibrosas (Figura 3) que resultam em alterações estruturais e funcionais (BISSEL; ROULOT; GEORGE, 2001; FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN, ALOMAN, 2009).

Na esquistossomose, a fibrose é decorrente da resposta inflamatória granulomatosa aos antígenos liberados pelos ovos do parasito presos nos sinusóides hepáticos e é limitada ao espaço periportal, sem haver comprometimento do parênquima hepático nem progressão para cirrose (ABATH et al., 2006; PEARCE; MacDONALD, 2002). O acúmulo de tecido fibroso em decorrência da formação do granuloma pode obstruir o fluxo sanguíneo portal, resultando em hipertensão portal e suas sequelas (esplenomegalia e varizes gastroesofagianas), o que causa morbidade e mortalidade associada com a esquistossomose (BURKE et al., 2009).



**Figura 3** – Processo fibrogênico na esquistossomose mansônica.  
Fonte: Esquema elaborado pela autora.

## 2.8 Marcadores biológicos da fibrose hepática

Muitas citocinas estão envolvidas na regulação da produção de proteínas da ECM, entre as quais, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 são as mais importantes (HENRI et al., 2002). Em particular, o TGF- $\beta$  tem sido implicado na resposta à lesão hepática, incluindo a fibrogênese. No fígado normal, as células de Kupffer (macrófagos ligados ao endotélio) produzem fatores que previnem a síntese de colágeno pelas células estreladas. Na vigência da lesão hepática, essas células ativadas sintetizam citocinas e induzem a expressão do TGF- $\beta$ , que, por sua vez, promove a proliferação das células estreladas e a deposição de colágeno (FRIEDMAN; PHAIR, 2003). O TNF- $\alpha$  é um potente indutor no metabolismo do colágeno encontrado na matriz extracelular e, age nas células de Kupffer, aumentando a produção de proteínas da ECM. Alguns estudos tem mostrado uma significativa associação entre altos níveis dessa citocina e a presença de fibrose hepática severa em indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002), sendo também encontrada elevada em pacientes com EHE (MAGALHÃES et al., 2004).

O IFN- $\gamma$  exerce um papel na regulação da ativação de fibroblastos e na síntese de colágeno através da inibição da diferenciação das células estreladas hepáticas e, conseqüentemente, a produção de ECM; e aumenta a atividade das collagenases do fígado pela estimulação da síntese de MP e pela inibição da síntese dos TIMPs (HENRI et al., 2002). De fato, o IFN- $\gamma$  é considerado uma citocina antifibrótica, já que casos de FPP severa foram associados com baixos níveis de IFN- $\gamma$  (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002; TALLAT et al., 2007) e que em modelos murinos, o IFN- $\gamma$  inibe a deposição de colágeno (STAVITSKY, 2004).

Fallon et al. (2000) verificaram que a remoção da IL-13 em camundongos infectados com o *S. mansoni* é benéfica para a sobrevivência do hospedeiro. Este prognóstico correlaciona-se com uma redução na deposição de colágeno, indicando que a IL-13 exerça um papel no desenvolvimento da fibrose hepática. Além disso, diferentes estudos sugerem que esta citocina estimule a produção de TGF- $\beta$  (KAVIRATNE et al., 2004; LEE et al., 2001). O papel fibrogênico da IL-13 parece provir de sua habilidade, junto com IL-4, em induzir a produção da enzima arginase em macrófagos. Essa enzima usa a L-arginina como um substrato para produzir a L-ornitina, que é convertida em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, conseqüentemente, no

desenvolvimento da fibrose (HESSE et al., 2001; PEARCE; MacDONALD, 2002; WILSON et al., 2007).

O desenvolvimento da fibrose no fígado é um processo complexo que envolve diferentes tipos de células e de mediadores que conduzam, eventualmente, ao depósito e à acumulação de numerosos componentes na matriz extracelular. Além de citocinas, as proteínas da ECM ou produtos do seu metabolismo e enzimas hepáticas circulantes estão envolvidos ou refletem o processo de fibrogênese (FRIEDMAN, 2008).

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano, sintetizado por células do tecido conectivo e, no fígado, pelas células estreladas, com um papel estrutural na matriz extracelular. É degradado pelas células sinusoidais hepática, e seu nível aumentado no soro pode estar relacionado à deficiência orgânica endotelial que ocorre enquanto a fibrose progride. Em estudos na esquistossomose humana, a concentração do ácido hialurônico no soro de pacientes estava correlacionada com os graus de FPP (RICARD-BLUM et al., 1999) e foi possível diferenciar pacientes com formas mais leves sem hipertensão portal daqueles com hipertensão portal (KÖPKE-AGUIAR et al., 2002). Em um estudo recente, os resultados demonstraram uma excelente correlação entre os níveis hepáticos e periféricos do AH em pacientes esquistossomóticos, revelando diferenças nos níveis séricos entre indivíduos sem fibrose dos pacientes com fibrose e também entre os graus de FPP leve e intensa (MARINHO et al., 2010) Esses estudos em conjunto associam o AH como um bom marcador para diagnosticar a fibrose na esquistossomose

Em relação às enzimas hepáticas, a determinação dos níveis de transaminases é muito útil para o diagnóstico de doenças com envolvimento hepático. A alanina aminotransferase (ALT) e o aspartato aminotranferase (AST) estão presente em grande quantidade nas células do fígado e o aumento nos níveis séricos servem como indicadores de dano hepático, sendo observado nos casos de fibrose (LEROY, 2008). Embora na fibrose provocada pelo *S. mansoni* não seja observado dano hepático, estudos tem demonstrado que a elevação das aminotransferases podem ocorrer devido à um processo inflamatório intenso e também serem úteis para definir o grau de envolvimento hepático na esquistossomose (COUTO et al., 2008; LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007;). E apesar da esquistossomose hepática não ser caracterizada pela presença da redução do fluxo biliar, já foram descritas elevações séricas de enzimas colestáticas ( $\gamma$ -glutamilttransferase -  $\gamma$ -GT e Fosfatase Alcalina – FA) em pacientes portadores das formas EHI ou EHE (AMARAL et al., 2002; MORAIS et al., 2010). O espessamento da parede dos ductos biliares pelo parasito pode ser resultante da infiltração de

células envolvidas na resposta inflamatória e da proliferação de fibroblastos (AMARAL et al., 2002).

As plaquetas, que também participam do processo de fibrogênese, produzem diversos mediadores, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o TGF- $\beta$  e o fator de crescimento epidérmico (EGC). A participação das plaquetas no processo de fibrose hepática pode ser evidenciada inicialmente pela sua capacidade de estarem presentes entre os capilares sinusóides e os hepatócitos (espaço Disse) (SOARES et al., 2007). A diminuição moderada no número de plaquetas é considerada como marcador de hipertensão portal nas formas graves da esquistossomose (SOUZA; TOLEDO; BORGES, 2000).

Dessa forma, diferentes marcadores biológicos (citocinas, bioquímicos e plaquetas) participam do processo de desenvolvimento da fibrose hepática na ocorrência da esquistossomose (Tabela 1). Muitos desses marcadores têm sido aplicados, isoladamente ou em conjunto, para a investigação da fibrose hepática, especialmente em pacientes com hepatite C. Índices biológicos, como por exemplo, Fibrotest, APRI, Forns, Hepascore, dentre outros (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007) vem sendo utilizados como uma metodologia complementar para acompanhar os pacientes após a realização da biópsia hepática.

Entretanto, é importante ressaltar que até o momento, na esquistossomose mansônica, não há nenhum marcador sérico utilizado isoladamente ou em conjunto que substitua na rotina ou complemente a USG no diagnóstico da FPP, demonstrando a importância do nosso estudo ao tentar construir um índice biológico de fibrose com os marcadores biológicos associados. A análise dos níveis desses marcadores demonstra ser de grande valor para avaliar o estágio da fibrose, monitorando a doença, como também intervindo na sua progressão e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

MARCADOR BIOLÓGICO	AÇÃO
TGF- $\beta$	Pró-fibrótica
TNF- $\alpha$	Pró- fibrótica
IL-13	Pró-fibrótica
IFN- $\gamma$	Anti-fibrótica
Ácido Hialurônico	Componente da ECM
Alanina Aminotransferase	Determinar o grau de lesão hepática
Aspartato Aminotransferase	Determinar o grau de lesão hepática
$\gamma$ -Glutamil Transferase	Espessamento da parede dos ductos biliares
Fosfatase Alcalina	Espessamento da parede dos ductos biliares
Plaquetas	Produção de Mediadores (TGF- $\beta$ )

**Quadro 1** – Ação dos marcadores biológicos no processo fibrogênico na esquistossomose mansônica

### 3 JUSTIFICATIVA

Devido à importância da esquistossomose na saúde pública mundial com mais de 200 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 10% com a forma grave da doença (desenvolvimento de FPP, resultando em hipertensão portal e suas sequelas), o estudo de novos métodos para o diagnóstico das alterações hepáticas relacionado com esta doença, fornece informações para desenhar medidas de conduta em relação ao paciente infectado e estratégias para prevenir a transição da doença para as formas graves. A possibilidade de construção de um Índice Biológico como método não invasivo para avaliar o grau da fibrose é de fundamental importância na definição e no acompanhamento terapêutico dos pacientes e também na redução de custos financeiros com o diagnóstico para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Por isso, esperamos que esse trabalho contribua para o conhecimento de marcadores biológicos não invasivos que estejam associados com os graus de fibrose periportal, fornecendo um novo método de diagnóstico para facilitar o acompanhamento de pacientes esquistossomóticos com alterações hepáticas, principalmente nos pequenos centros de saúde em áreas endêmicas, onde não há acesso ao exame de ultrassonografia nem profissionais treinados para executá-lo.

**4 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual a associação entre o grau de fibrose hepática na esquistossomose mansônica com os níveis de marcadores biológicos (citocinas, bioquímicos e plaquetas)?

**5 HIPÓTESE**

Existe associação entre os níveis de marcadores biológicos e gravidade da fibrose hepática na esquistossomose mansônica.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre os níveis de marcadores biológicos com os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica.

### 6.2 Objetivos específicos

- a) Determinar os graus de fibrose periportal nos pacientes estudados através de ultrassonografia;
- b) Analisar os níveis séricos dos marcadores biológicos (plaquetas, ALT e AST,  $\gamma$ -glutamil transferase, fosfatase alcalina, ácido hialurônico, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-13);
- c) Associar os níveis séricos dos marcadores biológicos com os graus de fibrose periportal;
- d) Construir um Índice Biológico com os marcadores biológicos analisados, correlacionando com os graus de fibrose.

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 7.1 Cálculo da amostra e Desenho de estudo

Para a operacionalização do estudo, foi realizado um cálculo amostral baseado na prevalência (60%) e média de pacientes diagnosticados para esquistossomose mansônica no ambulatório de Esquistossomose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) no período de 01 ano, com um atendimento de aproximadamente 600 pacientes. Para o cálculo da amostra foi utilizado um percentual de exposição de 30% entre os controles, uma *Odds Ratio* (OR) mínima de 3,5, um risco de 5%, poder de 80% e uma razão de 0,4 (2,5 casos para cada controle), com isso, resultando em 86 casos e 34 controles (n = 120 pacientes).

Diante disso, o desenho de estudo do presente trabalho consiste em um corte transversal com grupos de comparação interna.

### 7.2 Seleção de pacientes

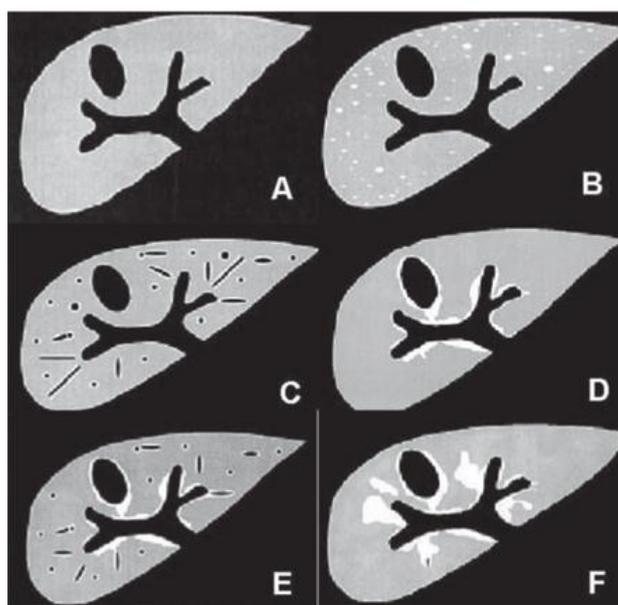
Pacientes diagnosticados com esquistossomose mansônica de ambos os sexos com idade entre 18 a 65 anos foram selecionados, no período de julho de 2009 a agosto de 2010, no ambulatório de Esquistossomose do HC/UFPE, que atende pacientes provenientes de todo o estado de Pernambuco. O diagnóstico foi baseado na história clínica, exame físico e USG do abdômen superior. Os pacientes foram estudados após tratamento específico contra a parasitose.

Foram critérios de exclusão para a seleção dos pacientes aqueles que apresentaram: diagnóstico clínico, laboratorial ou ultrassonográfico compatíveis com hepatopatias de outras etiologias (hepatite B ou C, cirrose hepática, doença hepática alcoólica ou esteatose hepática), consumo abusivo de álcool (> 210 g/semana para homens e > 140 g/semana para mulheres), uso de imunossupressores ou fármacos hepatotóxicos, transplante de fígado, doença renal crônica e pacientes esquistossomóticos esplenectomizados.

Um grupo de 16 indivíduos sadios de ambos os sexos e com idade variando entre 21 e 57 anos, funcionários de Serviços Gerais do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), da mesma classe sócio-econômica dos pacientes selecionados, foi utilizado como grupo controle de referência para os testes laboratoriais dos níveis dos marcadores biológicos. Todos apresentaram 3 exames parasitológicos de fezes negativos (método Kato-Katz) para *S. mansoni* e também testes sorológicos não reagentes para anti-HCV (hepatite C) e HBsAg (hepatite B). Todos os exames foram realizados no Laboratório do HC/UFPE.

### 7.3 Avaliação do grau de fibrose periportal

O grau de fibrose dos pacientes com esquistossomose hepática foi avaliado pelo exame de USG abdominal superior no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), setor de Endoscopia Digestiva do HC/UFPE. Para isto, foi utilizado o aparelho Siemens Acuson X 150<sup>®</sup> com transdutor convexo de 3,5 MHz, sendo realizado em todos os pacientes por um mesmo médico, seguindo a classificação de Niamey (RICHTER et al., 2001). Essa classificação caracteriza a fibrose periportal em seis padrões:



**Figura 4** – Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Niamey.

Fonte: Richter et al. (2001).

**Nota:** A – ausência; B – duvidosa (céu estrelado); C – periférica; D – central; E – avançada; F – muito avançada.

#### 7.4 Avaliação dos marcadores biológicos

Os marcadores biológicos estudados foram divididos em bioquímicos, citocinas e plaquetas que estão envolvidos ou refletindo o processo fibrogênico. Em todos os pacientes foram coletados, através do sistema vacutainer, 15 ml de sangue, sendo 10 ml sem anticoagulante, o qual foi centrifugado à 1500 xg para separação do soro utilizado na dosagem dos marcadores bioquímicos e citocinas, e 5 ml coletados com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para a quantificação das plaquetas.

##### 7.4.1 Dosagem de marcadores bioquímicos

Os marcadores bioquímicos estudados foram: ALT, AST,  $\gamma$ -GT, FA e AH. Exceto o último marcador, os demais foram dosados no Laboratório de Bioquímica do HC/UFPE através do aparelho automatizado ARCHITECT - UV Diasys e por Automação Siemens - Dimension. Os níveis séricos dos marcadores foram expressos como razão do limite superior de normalidade (LSN). Para a dosagem do ácido hialurônico, uma alíquota (500  $\mu$ l) de soro de cada paciente foi armazenada a - 20°C e realizada no Departamento de Bioquímica, Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).

A dosagem do AH foi determinada através de um método imunofluorimétrico, não competitivo, *ELISA-like*, baseado na afinidade do AH por proteínas específicas da cartilagem, seguindo um método desenvolvido no laboratório da UNIFESP-EPM (MARTINS et al., 2003). Resumidamente, uma proteína de ligação específica para o AH foi extraída de cartilagem bovina e usada tanto como “coat” em placa de ELISA assim como “sonda” biotinizada. A concentração do ácido hialurônico foi determinada nos soros (100  $\mu$ l) dos pacientes após proteólise com 4 mg/ml de maxatase (300  $\mu$ l) (protease alcalina; Biocon do Brasil Industrial Ltda – RJ, Brasil) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8. Soluções padrões de AH (0-1000 ng/mL) e as amostras dos pacientes foram diluídas em tampão de trabalho (Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 + albumina bovina 1%), e colocadas, em triplicatas (100  $\mu$ l cada), em placas de ELISA previamente revestidas com a proteína de ligação, e deixadas em repouso por 8 horas a 4° C. Seguindo incubação de 2 horas com a proteína de ligação marcada com

biotina (100 µl) e, após 12 lavagens da placa com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75), uma incubação de 30 minutos com estreptavidina marcada com európio (100 µl). Após lavagem da placa com o tampão de lavagem foi adicionada uma solução de *enhancement* (200 µl) e deixado sob agitação por 10 minutos. Ao final, a placa foi colocada em um fluorímetro (1420 *Multilabel Counter-Victor 2*) para a determinação da fluorescência emitida. Um programa de cálculo interpretou os dados e forneceu os resultados da concentração sérica do AH em ng/ml, cuja sensibilidade foi de 0,2 – 500 ng/ml.

#### 7.4.2 Dosagem de citocinas

As citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-13 foram dosadas no soro dos pacientes através de *kit* Quantikine R&D Systems, seguindo as instruções do fornecedor, no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia – CPqAM/Fiocruz. A dosagem foi realizada através da técnica de ELISA “sandwich”, no qual a presença da citocina específica é revelada por meio de anticorpos policlonais conjugado a uma enzima que, na presença de um substrato, forma um produto colorido.

Placas de poliestireno de 96 poços foram pré-sensibilizadas pelo fabricante com anticorpos monoclonais específicos anti-TNF- $\alpha$ , anti-TGF- $\beta$ , anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-13 respectivamente. Os padrões das citocinas foram preparados através da reconstituição das citocinas recombinantes liofilizadas com a adição de água deionizada ou de diluentes apropriados contidos no kit, resultando em soluções estoque de 1000 pg/ml para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; 2000 pg/ml para TGF- $\beta$  e 4000 pg/ml para IL-13 que foram utilizadas como o padrão de maior concentração. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições seriadas com fator 2 em diluente apropriado, sendo o mesmo diluente usado também como o padrão zero (branco). Em seguida, foi adicionado nas placas tampão protéico diluente do ensaio para bloquear sítios inespecíficos com 100 µl/poço para a dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-13 e 50 µl/poço para TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Posteriormente foram adicionados, em duplicatas, 50 µl/poço dos soros para a dosagem de TGF- $\beta$ , 100 µl/poço dos soros para IFN- $\gamma$  e IL-13 e 200 µl/poço para a dosagem de TNF- $\alpha$ . Como também, em duplicata, os padrões diluídos para as respectivas citocinas. As placas foram incubadas por 2hs à temperatura ambiente (TA), sendo posteriormente lavadas com solução tampão 3 vezes. Após essa etapa, foram adicionados 200 µl/poço (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-13) e 100 µl/poço (TGF- $\beta$ ) de anticorpos policlonais conjugados

à enzima peroxidase, específicos para as respectivas citocinas, e incubados novamente por 2hs à TA. Após mais uma etapa de lavagem, foram adicionados 200 µl/poço (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-13) e 100 µl/poço (TGF- $\beta$ ) da solução de substrato formada por volumes iguais dos reagentes de cor A (peróxido de hidrogênio) e B (tetrametilbenzidina, cromógeno) e as placas foram incubadas por 20 minutos para TNF- $\alpha$  e 30 minutos para as demais citocinas à TA, protegidas da luz. Depois desse período, a reação foi bloqueada pela adição de 100 µl/poço (TGF- $\beta$ ) e 50 µl/poço (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-13) da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A intensidade da cor produzida em cada poço foi medida em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda duplo de 450/595 nm.

As leituras e os cálculos das concentrações referentes as dosagens das diferentes citocinas foram feitos com o *software* Microplate Manager, versão 4.0 (Biorad laboratories), seguindo os valores de sensibilidade para cada citocina descritos pelo fornecedor. Para TNF- $\alpha$  foi considerada uma sensibilidade de 0,5 – 5,5 pg/ml, TGF- $\beta$ , sensibilidade de 1,7 – 15,4 pg/ml, IFN- $\gamma$  < 8 pg/ml e para IL-13, uma sensibilidade < 32 pg/ml.

#### 7.4.3 Dosagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada através do contador automático CELL DYN 3000 no Laboratório de Hematologia do HC/UFPE. Foi considerado como valor de referência utilizado no presente estudo, o número de plaquetas entre 150.000 a 450.000 células/mm<sup>3</sup>.

#### 7.5 Análise estatística e Índice biológico

Para a realização da análise estatística, os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com o padrão de fibrose periportal. O grupo 1 foi denominado controle, sendo formado por pacientes esquistossomóticos sem desenvolvimento de fibrose periportal, portanto, com padrões A e B. O grupo 2 foi constituído por pacientes com fibrose estabelecida e denominado caso. Porém, esse grupo foi subdividido em 2 categorias, da seguinte forma: FPP moderada (pacientes com padrões C e D) e FPP avançada (padrões E e F).

A análise foi realizada no Laboratório de Métodos Quantitativos do Departamento de Saúde Coletiva (NESC) do CPqAM, utilizando-se o *software R (The R Project for Statistical Computing, R Development Core Team)* – versão 2.10 para análise dos resultados. Para testar a suposição de homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Bartlett. Para análise comparativa das variáveis quantitativas (marcadores biológicos e idade) foi utilizado o teste *one-way* quando não observado o pressuposto de homogeneidade com o pós-teste *pairwise t-test*. Quando foi observado o pressuposto de homogeneidade, foi utilizado o teste ANOVA com o pós-teste de Tukey. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas (sexo e grau de FPP) foi aplicado o teste de qui-quadrado. A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Com o objetivo de avaliar o desempenho de cada marcador em diferenciar os grupos de FPP, os parâmetros de sensibilidade, especificidade e *likelihood ratio* e a curva ROC (*Receiver Operating characteristic*) foram determinados.

Para a formulação do índice biológico, foi realizada uma análise através da técnica de regressão logística, que permite avaliar ao mesmo tempo os efeitos de todas as variáveis. Foram incluídos nessa análise todos os marcadores que apresentaram  $p < 0,25$  na análise univariada entre os grupos de fibrose. Fórmulas com escores de risco que melhor poderiam prever a presença de FPP foram construídas incorporando diferentes grupos de variáveis independentes no modelo de regressão. O valor diagnóstico de cada índice foi avaliado através da curva ROC. Também foi realizada a correlação de Pearson entre o índice biológico e os padrões de FPP.

Os gráficos e tabelas foram construídos utilizando-se os programas *Graphpad Prism 5* e *Microsoft Excel 2007*, respectivamente.

## 8 ASPECTOS ÉTICOS

Esse trabalho faz parte de um projeto que foi submetido e aprovado no CNPq no programa Papes/Fiocruz – Papes V, com o título “Associação entre marcadores biológicos com os graus de fibrose hepática e a atividade inflamatória no complexo hepatite C e esquistossomose”, cuja coordenadora é a Dra. Clarice N. Lins de Moraes. Com parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM de nº 44/03 (Anexo A).

Os pacientes esquistossomóticos e indivíduos saudáveis selecionados no estudo tiveram participação voluntária, e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice A e B), com respeito às normas da resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96. Além disso, também responderam a um questionário de pesquisa (Apêndice C).

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Caracterização da amostra

Dos 120 pacientes esquistossomóticos selecionados para o estudo, 45 (37,5%) eram do sexo masculino e 75 (62,5%) do sexo feminino. Com idade média de 48,3 ( $\pm$  12,8) anos e maior prevalência para a faixa etária de 40 < 60 anos (51,7%) (Tabela 2).

**Tabela 1** – Distribuição dos 120 pacientes esquistossomóticos por idade e sexo

<b>Variável</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Faixa etária (anos)</b>		
< 20	3	2,5
20 < 40	29	24,1
40 < 60	62	51,7
$\geq$ 60	26	21,7
Total	120	100
<b>Sexo</b>		
Masculino	45	37,5
Feminino	75	62,5
Total	120	100

**Nota:** n – número de pacientes.

Na distribuição dos pacientes em relação ao local de contato com coleções hídricas contaminadas e procedência atual, a maioria (73,4%) dos pacientes relatou municípios localizados na Região da Zona da Mata, sendo observado que a moradia permanecia na mesma área endêmica (Tabela 3).

**Tabela 2** – Distribuição dos pacientes esquistossomóticos quanto à localização do banho de rio e procedência atual

Banho de rio	Procedência atual							
	RMR		ZM		AGR		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>RMR</b>	19	15,8	1	0,8	0	-	20	16,6
<b>ZM</b>	2	1,6	88	73,4	1	0,8	91	75,9
<b>AGR</b>	1	0,8	0	-	8	6,6	9	7,5
<b>Total</b>	22	18,3	89	74,2	9	7,5	120	100

**Nota:** RMR–Região Metropolitana do Recife; ZM–Zona da Mata; AGR–Agreste; n–número de pacientes.

Através do exame de USG abdominal foi diagnosticado o padrão de FPP nos pacientes, dos quais 20 (16,6%) foram classificados com os padrões A e B, formando o grupo controle. Entre os pacientes que formaram o grupo de casos, 50 (41,7%) apresentavam padrões de FPP C e D; e 50 (41,7%) foram diagnosticados com padrões E e F. No grupo formado pelos padrões A e B, 6 pacientes eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino. No grupo C+D, 15 eram do sexo masculino e 35 do feminino e entre o grupo E+F, 24 do sexo masculino e 26 do sexo feminino. Não houve diferença estatística em relação ao sexo entre os grupos estudados. A idade média nos três grupos (A+B, C+D e E+F) foi 43,3, 46,4 e 52,1 anos, respectivamente, com diferença significativa entre os grupos A+B e E+F ( $p = 0,026$ ) (Tabela 4).

**Tabela 3** – Características dos pacientes em relação aos padrões de fibrose periportal (FPP)

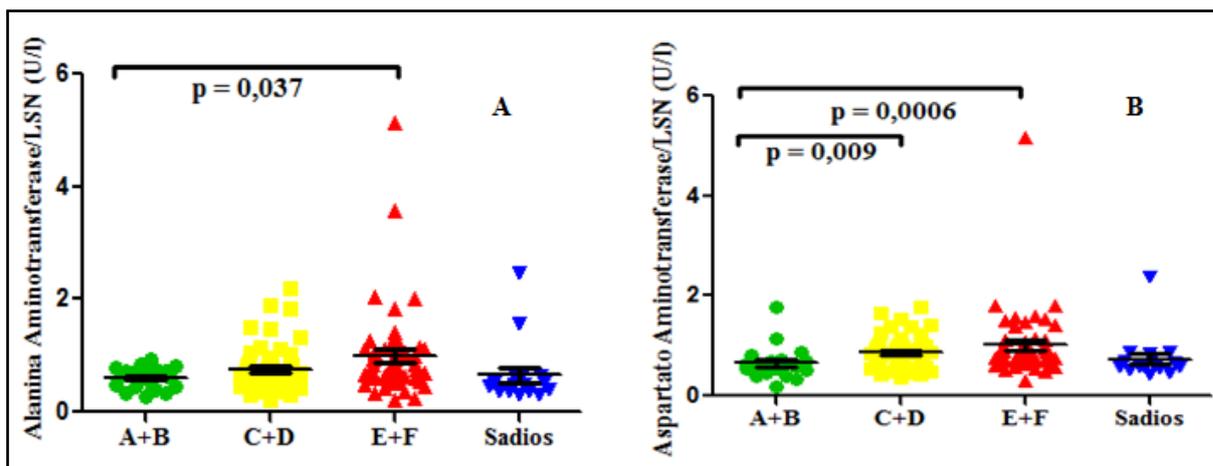
Características		Grupo de FPP		
		A+B	C+D	E+F
n (%)		20 (16,6)	50 (41,7)	50 (41,7)
Idade em anos (média±DP)		43,3 ± 12,65	46,4 ± 14,71	52,1 ± 9,58*
Sexo (%)	M	6 (30)	15 (30)	24 (48)
	F	14 (70)	35 (70)	26 (52)
Padrão de FPP (%)	A	12 (60)	-	-
	B	8 (40)	-	-
	C	-	15 (30)	-
	D	-	35 (70)	-
	E	-	-	40 (80)
	F	-	-	10 (20)

**Nota:** Padrões de fibrose periportal: A – ausência de fibrose; B – fibrose duvidosa; C – fibrose periférica; D – fibrose central; E – fibrose avançada; F – fibrose muito avançada; n – número de indivíduos estudados; ±DP – Desvio Padrão; M – Masculino; F – Feminino; \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo A+B.

## 9.2 Relação entre níveis de marcadores bioquímicos com os graus de fibrose periportal

Os níveis séricos dos marcadores bioquímicos estudados: transaminases (ALT e AST), gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina (FA) e ácido hialurônico (AH) foram quantificados e comparados entre os 3 grupos de fibrose.

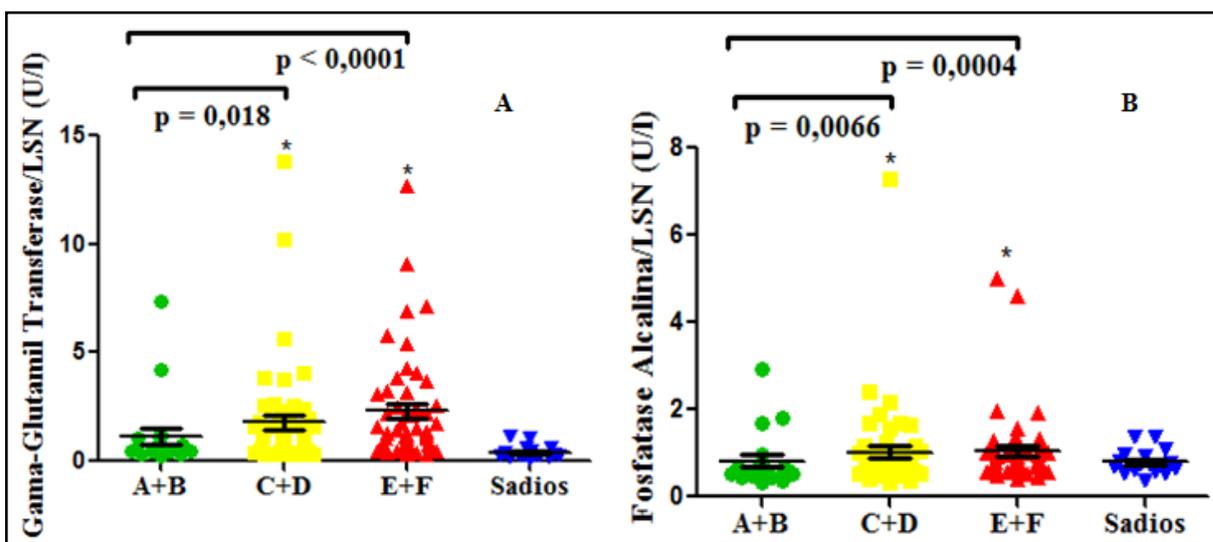
A ALT apresentou níveis séricos considerados normais nos grupos estudados, com média de 0,83 ( $\pm$  0,61) U/l, com uma discreta elevação no grupo E+F (1,00  $\pm$  0,81 U/l), porém considerada limítrofe. Apesar da normalidade, foi observada uma relação positiva com o grau de fibrose, ou seja, aumento dos níveis séricos com o avanço do grau de fibrose periportal (Figura 5A). Também foi verificado que 20, 22 e 38% dos pacientes A+B, C+D e E+F, respectivamente, apresentavam aumento dos níveis séricos de ALT. E quando foi comparado entre os grupos com diferentes graus de fibrose, este marcador diferenciou o grupo A+B do grupo E+F ( $p = 0,037$ ). Quanto à AST, foi observada uma média de 0,89 ( $\pm$  0,53) U/l nos pacientes estudados, com relação positiva com os graus de fibrose (Figura 5B). Entre os pacientes foi observado, apenas, aumento dos níveis séricos nos grupos C+D e E+F (18 e 22% dos pacientes, respectivamente). Ao comparamos os níveis de AST entre os grupos com diferentes graus de fibrose, foi observada diferença estatística entre A+B e C+D ( $p = 0,009$ ) e A+B e E+F ( $p = 0,0006$ ).



**Figura 5** – Níveis séricos de transaminases (A – Alanina aminotransferase; B – Aspartato aminotransferase) em pacientes esquistossomóticos e grupo de sadios.

**Nota:** Os símbolos representam os níveis séricos de cada paciente. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A+B = sem fibrose; C+D = fibrose periportal moderada; E+F = fibrose periportal avançada.

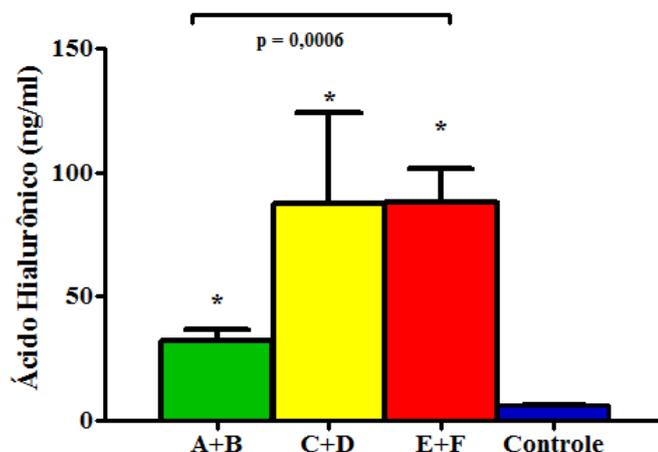
Em relação às enzimas colestáticas,  $\gamma$ -GT e FA, foram observados aumento nos níveis séricos no grupo de pacientes com fibrose avançada (E+F) com média de 2,31 ( $\pm$  2,24) U/l e 1,03 ( $\pm$  0,46) U/l, respectivamente. A média do nível sérico de  $\gamma$ -GT apresentou-se elevada em comparação aos valores de normalidade ( $1,90 \pm 2,36$  U/l), com 5, 22 e 50% dos pacientes com níveis aumentados em cada grupo de fibrose. Os grupos C+D e E+F apresentaram níveis mais elevados de  $\gamma$ -GT quando comparados ao A+B ( $p = 0,018$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) e ao grupo de indivíduos sadios ( $p = 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 6A). Quanto à FA foi observado aumento dos níveis séricos nos pacientes com fibrose, 26% dos pacientes do grupo C+D e 28% do grupo E+F. Em comparação com os graus de fibrose, pacientes C+D e E+F apresentaram aumento dos níveis séricos de FA quando comparados aos pacientes do grupo A+B ( $p = 0,0066$  e  $p = 0,0004$ , respectivamente) e ao grupo de indivíduos sadios ( $p = 0,02$  e  $p = 0,003$ , respectivamente) (Figura 6B).



**Figura 6** – Relação entre os níveis séricos das enzimas colestáticas (A – gama-Glutamyl transferase; B – Fosfatase alcalina) com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.

**Nota:** Os símbolos representam os níveis séricos de cada paciente. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. \* Indica  $p < 0,05$  nos grupos de pacientes comparados ao controle sádio. A+B = sem fibrose; C+D = fibrose periportal moderada; E+F = fibrose periportal avançada.

Os níveis de ácido hialurônico variaram de 4,4 a 1783,1 ng/ml, com média de 78,2 ( $\pm$  178,5) ng/ml nos pacientes esquistossomóticos. Em comparação aos padrões de fibrose, a média da concentração do AH foi de 31,96 ( $\pm$  20,1) ng/ml no grupo A+B, 87,13 ( $\pm$  259,2) ng/ml no grupo C+D e 87,95 ( $\pm$  94,7) ng/ml nos pacientes E+F, com diferença significativa entre os grupos A+B e E+F ( $p = 0,0006$ ) e entre os indivíduos do grupo controle de sádios com os 3 grupos de fibrose estudado ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,009$  e  $p < 0,0001$  entre A+B, C+D e E+F, respectivamente) (Figura 7).



**Figura 7** – Concentração sérica de ácido hialurônico em relação aos padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.

**Nota:** As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. \* Indica  $p < 0,05$  nos grupos de pacientes comparados ao controle sádio. A+B = sem fibrose; C+D = fibrose periportal moderada; E+F = fibrose periportal avançada.

Para avaliar o desempenho dos marcadores bioquímicos estudados na diferenciação dos graus de fibrose entre os pacientes esquistossomóticos foram estabelecidos os parâmetros: acurácia, representada pela área abaixo da curva (AAC) ROC, sensibilidade, especificidade e *likelihood ratio* para os marcadores que tiveram diferença significativa entre os grupos de fibrose periportal. Em relação aos graus de fibrose, destacaram-se os seguintes marcadores bioquímicos:  $\gamma$ -GT com AAC de 0,851, sensibilidade de 82% e especificidade de 85%; FA com AAC de 0,875, sensibilidade de 78% e especificidade de 95%; e AH com AAC de 0,817, sensibilidade de 78% e especificidade de 75%, entre os grupos A+B e E+F (Tabela 5).

**Tabela 4** – Desempenho dos marcadores bioquímicos como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica

Marcador (Grupo de FPP)	AAC	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	p-valor
<b>ALT (A+B;E+F)</b>	0,6430	54 % (39,3-68,2%)	70% (45,7-88%)	1,8	0,66	0,06
<b>AST (A+B;C+D)</b>	0,6740	66% (51,2-78,8%)	65% (40,8-84,5%)	1,89	0,52	0,02
<b>(A+B;E+F)</b>	0,7915	80% (66,3-90%)	65% (40,8-84,5%)	2,29	0,31	0,003
<b><math>\gamma</math>-GT (A+B;C+D)</b>	0,688	48% (33,7-62,6%)	85% (62,1-96,6%)	3,2	0,61	0,01
<b>(A+B;E+F)</b>	0,851	82% (68,2-91,4%)	85% (62,1-96,6)	5,47	0,21	0,005
<b>FA (A+B;C+D)</b>	0,766	60% (45,2-73,6%)	95% (75,1-99,2%)	12	0,42	0,009
<b>(A+B;E+F)</b>	0,875	78% (64-88,5%)	95% (75,1-99,2%)	15,6	0,23	0,0008
<b>AH (A+B;E+F)</b>	0,817	78% (64-88,5%)	75% (50,9-91,2%)	3,12	0,29	0,0011

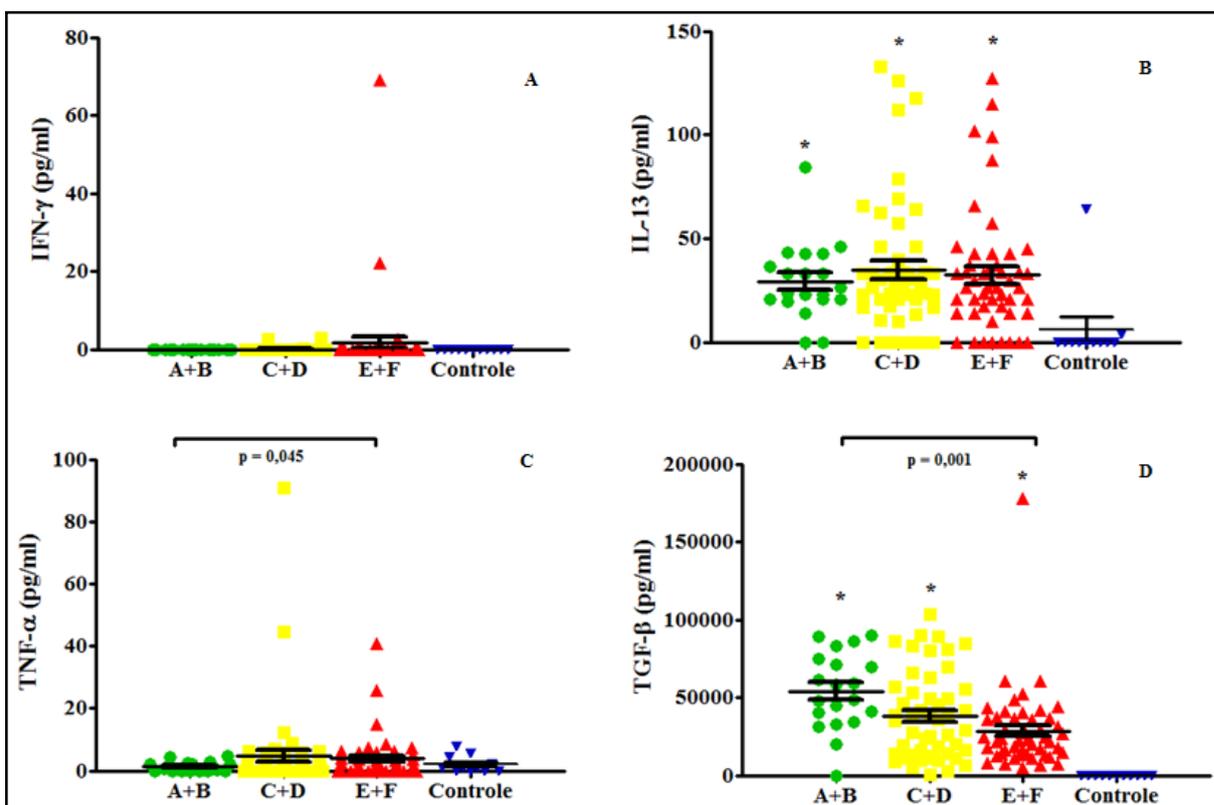
**Nota:** FPP – Fibrose periportal; A+B = sem fibrose; C+D = fibrose moderada; E+F = fibrose avançada; AAC – Área Abaixo da Curva; IC – Intervalo de Confiança; LR+ – *Likelihood ratio* positivo; LR- – *Likelihood ratio* negativo.

### 9.3 Relação entre níveis de citocinas com os graus de fibrose periportal

Em relação às citocinas seleccionadas para o estudo, o IFN- $\gamma$  foi detectado em apenas 6 pacientes, dos quais 3 foram diagnosticados com fibrose moderada e 3 com fibrose avançada. Devido ao pequeno número de amostras com IFN- $\gamma$ , não foi possível realizar a análise estatística entre os grupos de fibrose. Os níveis séricos de IL-13 variaram de 0 a 132,9 pg/ml com média de 32,9 ( $\pm$  29,1) pg/ml e foi detectada em 90, 84 e 84% dos pacientes dos 3 grupos analisados (A+B, C+D e E+F, respectivamente), entretanto, não apresentou diferença significativa dos níveis séricos entre os grupos de fibrose estudados. Mas ao comparar os níveis séricos de IL-13 com os indivíduos sadios, foi observado que todos os pacientes esquistossomóticos apresentaram níveis maiores ( $p = 0,01$ ,  $p = 0,004$  e  $p = 0,006$  entre A+B, C+D e E+F, respectivamente).

As citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  apresentaram diferenças estatísticas significativas quando os grupos de pacientes do grupo A+B foram comparados com os pacientes do grupo E+F ( $p = 0,045$  e  $0,001$ , respectivamente). O TNF- $\alpha$  foi detectado em 65, 58 e 62% dos pacientes de cada grupo com níveis séricos variando de 0 a 90,7 pg/ml (média =  $3,8 \pm 10,1$  pg/ml). O TGF- $\beta$  foi detectado em todos os pacientes com variação dos níveis séricos de 397,6 a 177758 pg/ml e média de 36843,2 ( $\pm$  27675,5) pg/ml. Ao analisarmos os níveis de TGF- $\beta$  em relação aos graus de fibrose obtidos pela ultrassonografia dos pacientes, observamos uma correlação negativa com a FPP, ou seja, quanto mais avançada a fibrose menor os níveis séricos de TGF- $\beta$ . Foi observado que os indivíduos sadios apresentaram níveis séricos menores de TGF- $\beta$  quando comparados aos pacientes esquistossomóticos com  $p < 0,0001$  para os 3 grupos estudados.

Os níveis séricos das citocinas estudados são representados na Figura 8 e o desempenho das citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  como preditores dos graus de fibrose periportal são demonstrados na Tabela 6.



**Figura 8** – Relação entre os níveis séricos de citocinas (A – IFN $\gamma$ ; B – IL-13; C – TNF- $\alpha$ ; D – TGF- $\beta$ ) com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos e grupo controle.

**Nota:** Os símbolos representam os níveis séricos de cada paciente. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. \* Indica  $p < 0,05$  nos grupos de pacientes comparados ao controle de sadios. A+B = sem fibrose; C+D = fibrose periportal moderada; E+F = fibrose periportal avançada.

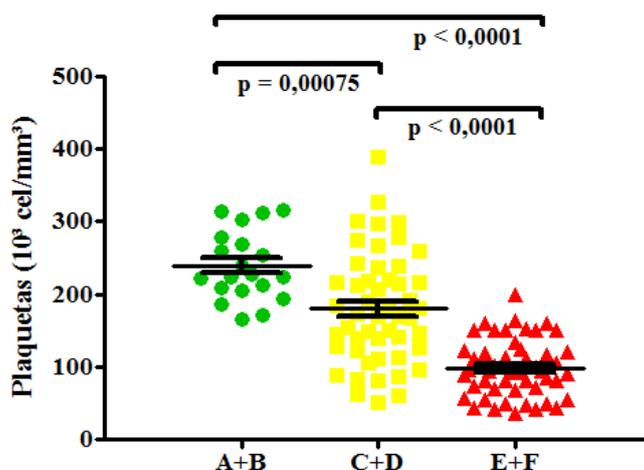
**Tabela 5** – Desempenho das citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica

Marcador (Grupo de FPP)	AAC	Cut-off	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	p-valor
TNF- $\alpha$ (A+B;E+F)	0,597	> 3	44 % (30-58,7%)	90% (68,3-98,5%)	4,4	0,62	0,09
TGF- $\beta$ (A+B;E+F)	0,828	< 29352	68% (53,3-80,5%)	90% (68,3-98,5%)	6,8	0,36	0,002

**Nota:** FPP – Fibrose periportal; A+B = sem fibrose; E+F = fibrose avançada; AAC – Área Abaixo da Curva; IC – Intervalo de Confiança; LR+ – Likelihood ratio positivo; LR- – Likelihood ratio negativo.

#### 9.4 Relação entre o número de plaquetas com os graus de fibrose periportal

Após a realização da dosagem de plaquetas (por  $\text{mm}^3$ ) foi observada uma correlação negativa com os graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica (Figura 9). Em 26% dos pacientes do grupo C+D e em 80% dos pacientes do grupo E+F foi observado quadro de trombocitopenia. As médias do número de plaquetas nos grupos A+B, C+D e E+F foram 238, 180 e 98 ( $\times 10^3$  células/ $\text{mm}^3$ ), respectivamente. Pacientes com FPP avançada (grupo E+F) apresentavam diminuição acentuada do número de plaquetas quando comparados aos pacientes com fibrose moderada (grupo C+D) e pacientes sem fibrose ( $p < 0,0001$  para ambos os grupos). Além disso, o número de plaquetas demonstrou ser um bom marcador por diferenciar também pacientes com fibrose moderada dos pacientes sem fibrose ( $p = 0,00075$ ).



**Figura 9** – Relação entre o número de plaquetas com os padrões de fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos.

**Nota:** Os símbolos representam o número de plaquetas em cada paciente. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A+B = sem fibrose; C+D = fibrose periportal moderada; E+F = fibrose periportal avançada.

Analizamos também as curvas ROC, com melhores valores de *cut-off*, sensibilidade, especificidade e *likelihood ratio* positivo e negativo das plaquetas como marcador frente aos graus de fibrose periportal. O melhor desempenho foi observado na diferenciação entre os

grupos A+B e E+F com AAC de 0,996, sensibilidade de 98% e especificidade de 100% (Tabela 7).

**Tabela 6** – Desempenho das plaquetas como preditores dos graus de fibrose hepática na esquistossomose mansônica

Grupo de FPP	AAC	Cut-off	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	p-valor
A+B;C+D	0,757	< 185.000	58 % (43,2-71,8%)	90% (68,3-98,5%)	5,8	0,47	0,00075
A+B;E+F	0,996	< 163.00	98% (89,3-99,7%)	100% (83-100%)	6,4	0,2	< 0,0001
C+D;E+F	0,825	< 108.00	62% (47,1-75,5%)	82% (68,5-91,4%)	3,4	0,24	< 0,0001

**Nota:** FPP – Fibrose periportal; A+B = sem fibrose; C+D = fibrose moderada; E+F = fibrose avançada; AAC – Área Abaixo da Curva; IC – Intervalo de Confiança; LR+ – *Likelihood ratio* positivo; LR- – *Likelihood ratio* negativo.

### 9.5 Índice biológico

Para a construção do índice biológico foi realizada a técnica de regressão logística comparando-se os pacientes esquistossomóticos sem FPP com os pacientes com diagnóstico de FPP.

A análise multivariada mostrou que AST ( $p = 0,018$ ) ou FA ( $p = 0,0097$ ) e plaquetas ( $0,0005$ ) foram os preditores independente de FPP entre os pacientes com e sem fibrose (A+B versus C+D+E+F). Enquanto que AH ( $p = 0,0007$ ) e TGF- $\beta$  ( $p = 0,0005$ ) foram os preditores independentes entre os grupos A+B versus E+F. Devido à existência do índice APRI (AST/(ULN)/Plaquetas x 100), decidimos analisar a relação entre FA e plaquetas com a fibrose hepática na esquistossomose. Os escores de risco foram determinados através das seguintes fórmulas de regressão:

Escore de risco =  $0,823 - 0,00001 \times \text{Plaquetas} + 0,0395 \times \text{FA} / (\text{LSN})$  (A+B versus C+D+E+F)

Escore de risco =  $1,779 + 0,0583 \times \text{AH} - 0,0001 \times \text{TGF-}\beta$  (A+B versus E+F)

Após a realização da análise multivariada, foram construídos dois índices biológicos, denominados IB<sup>1</sup> e IB<sup>2</sup>. O primeiro (IB<sup>1</sup>) foi realizado para predizer a presença de FPP nos

pacientes esquistossomóticos, através dos marcadores FA e plaquetas, com a seguinte fórmula:

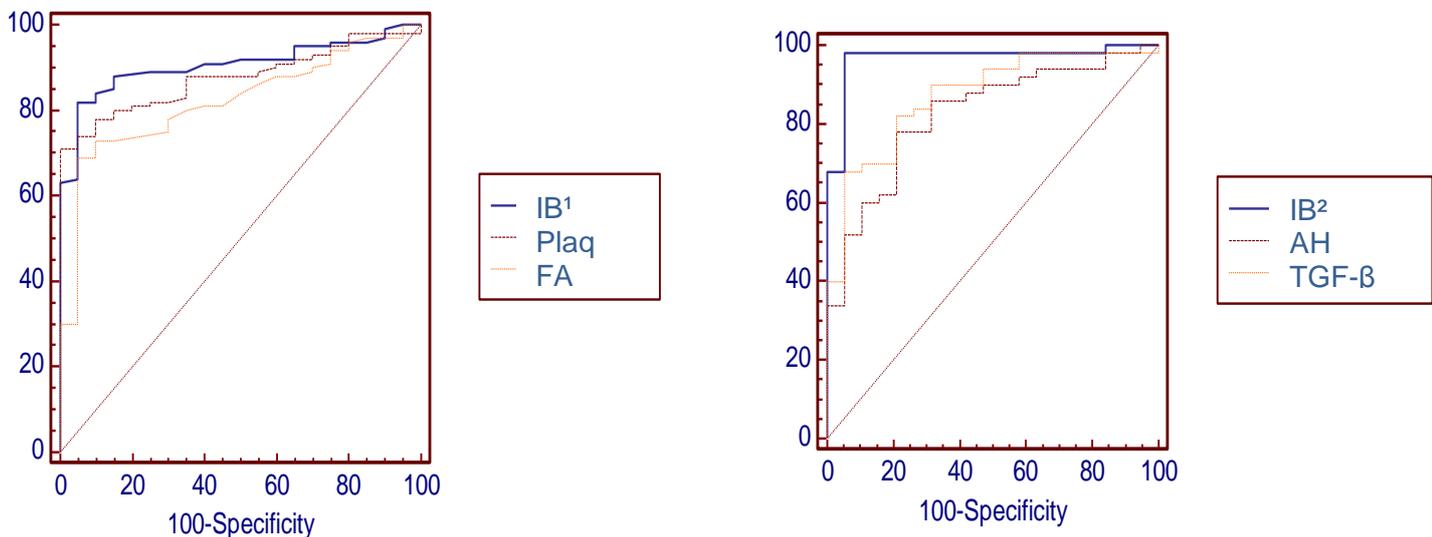
$$IB^1 = FA (/LSN)/ \text{Plaquetas} \times 100$$

Através da curva ROC (Figura 10A) foi observado que o  $IB^1$  mostrou uma boa acurácia (0,828) quando comparado com os marcadores isoladamente (0,82 – FA e 0,876 - plaquetas), como também uma boa correlação ( $r = 0,58$ ) com os padrões de FPP (Tabela 8).

O segundo índice ( $IB^2$ ) foi construído para identificar a presença de FPP avançada nos pacientes esquistossomóticos, utilizando os marcadores AH e TGF- $\beta$ , através da seguinte fórmula:

$$IB^2 = AH/ \text{TGF-}\beta \times 100$$

Com aplicação da curva ROC (Figura 10B) foi observado que o  $IB^2$  mostrou uma AAC maior (0,967) quando comparado aos marcadores isoladamente (0,825 – AH e 0,872 - TGF- $\beta$ ), apresentando também maior correlação ( $r = 0,72$ ) com os padrões de FPP do que os marcadores individuais (Tabela 8).



**Figura 10** – Comparação entre as Curvas ROC dos índices biológicos (A –  $IB^1$ ; B –  $IB^2$ ) com seus respectivos marcadores.

**Nota:**  $IB^1 = FA(/LSN)/ \text{Plaquetas} \times 100$ ;  $IB^2 = AH/ \text{TGF-}\beta \times 100$ .

**Tabela 7** – Correlação entre os índices biológicos com seus respectivos marcadores

<b>Variáveis</b>	<b>AAC (IC - 95%)</b>	<b>Correlação de Pearson</b>
<b>FA (/LSN)</b>	0,677 (0,585-0,759)	0,22
<b>Plaquetas</b>	0,876 (0,804-0,929)	- 0,49
<b>IB<sup>1</sup></b>	0,828 (0,748-0,891)	0,58
<b>AH</b>	0,825 (0,715-0,906)	0,50
<b>TGF-β</b>	0,872 (0,769-0,940)	- 0,51
<b>IB<sup>2</sup></b>	0,967 (0,894-0,995)	0,72

**Nota:** AAC – Área Abaixo da Curva; IC – Intervalo de Confiança; LSN – Limite Superior de Normalidade; IB<sup>1</sup> = FA(/LSN)/ Plaquetas x 100; IB<sup>2</sup> = AH/ TGF-β x 100; Somente valores significativos são demonstrados.

Baseados na curva ROC foram escolhidos 2 pontos de corte para verificar a ausência (IB<sup>1</sup> ≤ 0,20) ou presença de FPP (IB<sup>1</sup> ≥ 0,70) em pacientes esquistossomóticos. Através do IB<sup>1</sup>, 14 (70%) dos 20 pacientes estudados sem fibrose, apresentaram resultados ≤ 0,20 e 45 (45%) dos 100 pacientes com FPP pela USG, também tinham FPP pelo IB<sup>1</sup>. Os pacientes com IB<sup>1</sup> ≥ 0,70 tem 15,5 vezes mais chances de ter FPP (Tabela 8). Semelhantemente, dois pontos de corte foram escolhidos para prever a ausência (IB<sup>2</sup> ≤ 0,110) ou presença de FPP avançada (IB<sup>2</sup> ≥ 0,187). Dos 20 pacientes sem fibrose, diagnosticados pela USG, 19 (95%) apresentaram ausência de FPP através do IB<sup>2</sup> e entre os pacientes com FPP avançada pela USG, 35 (70%) tem o mesmo diagnóstico pelo IB<sup>2</sup>. Foi verificado que pacientes com IB<sup>2</sup> ≥ 0,187 apresentaram 44 vezes mais chances de terem FPP (Tabela 9).

**Tabela 8** – Desempenho dos índices biológicos frente ao diagnóstico da fibrose periportal através da ultrassonografia

IB <sup>1</sup>	A+B (n = 20)		C+D+E+F (n =100)		OR	IC 95%		p-valor
	n	%	n	%		Inf	Sup	
<b>Cut Off</b>								
≤ 0,20	14	70,0	5	5,0	1,00			
> 0,20	6	30,0	95	95,0	4,75	1,08	19,89	0,003
<b>Cut Off</b>								
< 0,70	19	95,0	55	55,0	1,00			
≥ 0,70	1	5,0	45	45,0	15,55	3,04	284,67	0,0087
IB <sup>2</sup>	A+B (n = 20)		E+F (n = 50)		OR	IC 95%		p-valor
	n	%	n	%		Inf	Sup	
<b>Cut Off</b>								
≤ 0,110	19	95,0	1	2,0	1,00			
> 0,110	1	5,0	49	98,0	12,25	1,67	249,21	0,0300
<b>Cut Off</b>								
< 0,187	19	95,0	15	30,0	1,00			
≥ 0,187	1	5,0	35	70,0	44,33	8,07	833,13	0,0004

IB<sup>1</sup> = FA(/LSN)/ Plaquetas x 100; IB<sup>2</sup> = AH/ TGF-β x 100; A+B = sem fibrose; C+D+E+F = presença de fibrose; E+F = fibrose avançada; n = número de pacientes; OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança; Inf – Inferior; Sup – Superior.

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, *likelihood ratio* e valor preditivo positivo e negativo dos dois índices biológicos foram determinados (Tabela 10). Os dois índices apresentaram maiores sensibilidade e especificidade quando comparados aos seus respectivos marcadores isoladamente avaliados, exceto pelo excelente desempenho das plaquetas como marcador da presença de FPP avançada.

**Tabela 9** – Desempenho dos índices biológicos em prever a fibrose hepática na esquistossomose mansônica

Índice Biológico	Cut Off	Sensibilidade (IC - 95%)	Especificidade (IC - 95%)	LR+	LR-	VPP	VPN
IB <sup>1</sup>	≤ 0,20	95 (88,7-98,3)	25 (8,8-49,1)	1,27	0,2	86,4	50
	≥ 0,70	45 (35-55,7)	95 (75,1 - 99,2)	9	0,58	97,8	25,7
IB <sup>2</sup>	≤ 0,110	98 (89,3 - 99,7)	94,7 (73,9 - 99,1)	18,62	0,02	98,0	94,7
	≥ 0,187	68 (53,3 - 80,5)	94,7 (73,9 - 99,1)	12,92	0,34	97,1	52,9

IB<sup>1</sup> = FA(/LSN)/ Plaquetas x 100; IB<sup>2</sup> = AH/ TGF-β x 100; IC – Intervalo de Confiança; LR+ – Likelihood ratio positivo; LR- – Likelihood ratio negativo; VPP - Valor preditivo positivo; VPN - Valor preditivo negativo.

## 10 DISCUSSÃO

A fibrose é a complicação mais importante na esquistossomose, na qual o fígado pode aumentar de volume e ficar contraído, desenvolver hipertensão portal resultando em esplenomegalia e varizes gastroesofágicas (MANZELLA et al., 2008). O tipo de fibrose observado na esquistossomose é a periportal, sem haver comprometimento dos hepatócitos nem progressão para cirrose (PEARCE; MACDONALD, 2002). A avaliação da presença e gravidade da fibrose hepática é essencial na determinação das estratégias de tratamento, prognóstico e diminuição do risco potencial para complicações em pacientes com doença hepática crônica.

Nos últimos anos, muitos estudos com marcadores não-invasivos, não somente para o diagnóstico da fibrose, mas para diferenciar os graus de fibrose em diversas doenças hepáticas, como Hepatite B, C, Cirrose e esteatose hepática, foram publicados. Esses marcadores foram usados em combinação para formação de escores de risco para fibrose, como o FibroTest e ActiTest (POYNARD et al., 2002, 2003, 2004, 2005), APRI (WAI et al., 2003), Forns index (FORNS et al., 2002), Hepascore (ADAMS et al., 2005), FIB-4 (STERLING et al., 2006), dentre outros. Entretanto, estudos entre a relação de biomarcadores com a fibrose hepática na esquistossomose é considerada pequena quando comparada aos estudos com hepatopatias de outras etiologias e a maioria dos escores foram desenvolvidos e testados em pacientes infectados pelo HCV e sua extrapolação para outras doenças fibrogênicas deve ser considerada com cautela (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007).

No presente estudo, buscamos desenvolver e propor um índice biológico que possa ser utilizado na avaliação da fibrose hepática na esquistossomose mansônica, considerando a hipótese de que existe associação entre os níveis de marcadores biológicos (bioquímicos, citocinas e plaquetas) com a gravidade da FPP.

Na análise univariada, nossos resultados revelaram que entre os marcadores bioquímicos, todos foram capazes de detectar a presença de fibrose hepática. Níveis elevados de ALT, AST,  $\gamma$ -GT, FA e AH diferenciaram pacientes esquistossomóticos sem fibrose dos pacientes com fibrose avançada e com exceção de ALT e AH, também diferenciaram o grupo sem fibrose do grupo C+D (FPP moderada). Os marcadores  $\gamma$ -GT, FA e AH apresentaram as melhores acurácias diagnósticas.

A concentração sérica das aminotransferases reflete o grau da lesão nos hepatócitos, uma vez que sua liberação no soro pode significar morte celular. Todavia, os efeitos da infecção pelo *S. mansoni* sobre o desempenho do fígado ainda são controversos e a fibrose na esquistossomose é limitada ao espaço periportal, sem haver comprometimento do parênquima hepático (ABATH et al., 2006; MORAIS et al., 2010; PEARCE; MacDONALD, 2002). Contudo, no presente estudo, níveis elevados das aminotranferases mostraram relação com a progressão da FPP, sugerindo que essas enzimas, principalmente a AST, podem ser úteis na avaliação das mudanças hepáticas provocada pela presença dos ovos do *S. mansoni* no tecido hepático.

As enzimas  $\gamma$ -GT e FA são marcadores séricos de processos colestáticos, sendo importantes no diagnóstico das hepatopatias. Recentes estudos demonstraram associação entre aumento dos níveis séricos de  $\gamma$ -GT com os graus de fibrose hepática em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, apresentando boa acurácia como marcador na discriminação entre fibrose significativa e não significativa (ADAMS et al., 2005; GRIGORESCU et al., 2007). Em relação à FA, foi mostrado por Morais et al. (2010) que esta enzima apresentou acurácia significativa como marcador biológico para predizer fibrose moderada e severa em pacientes com hepatite C. Na esquistossomose, diferentes autores propuseram que as alterações da árvore biliar intra hepática, quer por lesões ductais provocadas pelas reações ovulares quer decorrentes da FPP, poderiam ser o substrato anatômico para o aumento dessas enzimas (ALVES Jr et al., 2003; MACHADO et al., 2002).

Entretanto, na literatura científica há poucos dados entre a associação dessas enzimas colestáticas com os graus de FPP. Em um estudo realizado na Tanzânia foi observado que aumento nos níveis de  $\gamma$ -GT foi significativamente relacionado à FPP (KARDORFF et al., 1997), porém, Amaral et al. (2002) não encontrou associação entre níveis elevados de  $\gamma$ -GT e FA com a presença de fibrose hepática na esquistossomose. Os achados do presente estudo, associando a  $\gamma$ -GT e FA como preditores da FPP moderada e avançada com significativa acurácia diagnóstica, apresentam importante valor no conhecimento das alterações dos níveis séricos dessas enzimas no processo fibrogênico em decorrência da infecção pelo *S. mansoni*, como também, a utilização dessas enzimas como possíveis marcadores de FPP.

Verificou-se neste trabalho a elevação do AH no soro de pacientes esquistossomóticos, com boa acurácia diagnóstica para a presença da fibrose hepática avançada nesses pacientes. O AH é classificado como um marcador direto de fibrose hepática, por estar presente na ECM, sendo o marcador direto mais investigado em estudos relacionados com doenças

fibrogênicas (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007; LEROY, 2008; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PLEBANI, 2011).

Distintos autores compararam os níveis de AH com a FPP, apresentando diferentes resultados. Em um estudo realizado por Burchard et al. (1998) com pacientes provenientes de área com intensa transmissão do *S. mansoni*, não foi encontrada correlação entre níveis elevados de AH com a fibrose. Entretanto, em outro estudo, o AH foi o único marcador sérico que apresentou correlação com os escores ultrassonográficos de fibrose em pacientes esquistossomóticos, sugerindo-o como potencial marcador sérico de morbidade (RICARD-BLUM et al., 1999). Köpke-Aguiar et al. (2002) mostraram a utilidade do AH como marcador da presença de hipertensão portal na esquistossomose, com AAC de 0,78. Entretanto, não foi observada correlação do AH com a FPP. Porém, em um estudo publicado recentemente, o AH foi capaz de separar indivíduos com fibrose dos sem fibrose e também fibrose leve de fibrose intensa, com acurácia diagnóstica (AAC) para fibrose de 0,89 (MARINHO et al., 2010).

Os achados de Ricard-Blum et al. (1999) e Marinho et al. (2010) corroboram com os resultados do presente trabalho, no qual pacientes com padrões avançados de FPP (E+F) possuem concentrações séricas mais altas quando comparados aos pacientes sem fibrose. A fibrose é caracterizada pela deposição de componentes da ECM, entre eles o AH. Isto sugere que níveis séricos de AH se elevam durante o processo fibrogênico, devido à sua síntese aumentada pelas células estreladas hepáticas ativadas, indicando que progressivo dano hepático pode ser identificado e monitorado pela elevação dos níveis séricos do AH (PARSIAN et al., 2010).

Em relação à dosagem de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-13, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) e sua relação com a FPP, verificamos que apenas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  apresentaram relação com a fibrose. A análise da associação entre as citocinas e a fibrose hepática apresentou algumas limitações no presente trabalho: o estudo foi desenvolvido com indivíduos atendidos em hospital de referência para os estágios mais avançados da doença, após tratamento específico. Entretanto, para uma melhor análise do papel das citocinas na fibrose, o estudo deveria ser conduzido, de preferência, em pacientes com doença ativa do que em indivíduos com os estágios finais da doença; a dosagem das citocinas foi realizada no soro conservado a -20°C, amostra que apresenta menor sensibilidade de detecção comparada aos estudos com produção de citocinas em culturas de PBMC.

Quanto ao envolvimento das citocinas no desenvolvimento da fibrose hepática, tem sido sugerido que IFN- $\gamma$  exerça um importante papel na regulação da ativação de fibroblastos e da síntese de colágeno, e que altos níveis desta citocina estão associados à proteção contra o

desenvolvimento de FPP (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002; TALAAT et al., 2007). Entretanto, apenas em 5% dos pacientes selecionados para o estudo foi detectado IFN- $\gamma$ , não sendo possível realizar associação com os graus de FPP. Ao contrário, níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão associados com a presença de fibrose hepática grave em indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* (BOOTH et al., 2004; HENRI et al., 2002). Nossos resultados revelaram que TNF- $\alpha$  foi capaz de diferenciar pacientes com FPP avançada quando comparados aos pacientes sem fibrose, em acordo com os trabalhos mencionados. No entanto, ao analisar esta citocina como possível marcador para prever a presença de FPP avançada, não foi observada acurácia diagnóstica significativa (AAC = 0,597; p = 0,09), o que a exclui como possível biomarcador para fibrose hepática, já que um marcador não invasivo ideal deverá prever com exatidão a presença ou ausência de fibrose hepática significativa (THULUVATH; KROK, 2005).

Alguns estudos tem relatado o papel da IL-13 com o desenvolvimento da fibrose periportal em pacientes esquistossomóticos crônicos (CALDAS et al., 2008; deJESUS et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2004) e foi sugerido que esta citocina medeia seus efeitos regulando a produção e ativação do TGF- $\beta$  (LEE et al., 2001). O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica, conhecida por estar envolvida no desenvolvimento da fibrose hepática, promovendo a proliferação das células estreladas hepáticas e a deposição de colágeno na ECM (FRIEDMAN; PHAIR, 2003; FRIEDMAN, 2008; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009). Contudo, em nossos resultados, não foram detectadas diferenças nos níveis séricos de IL-13 entre os grupos de pacientes com e sem FPP. A metodologia empregada neste trabalho para a dosagem das citocinas difere dos métodos imunológicos nos estudos em que foi demonstrada significativa associação entre a IL-13 com a FPP, sugerindo a execução de estudos adicionais com cultura de PMBC estimuladas com antígenos do patógeno para detectar a citocina e determinar sua relação com a presença de FPP severa. Um estudo desenvolvido por Brandt et al. (2010) corrobora com essa sugestão, no qual foi empregada a mesma metodologia do presente estudo e não foi observada relação da IL-13 com os graus de fibrose em pacientes esquistossomóticos.

Quanto ao TGF- $\beta$  foi demonstrada uma correlação negativa com a FPP (r = - 0,51; p < 0,0001) e os pacientes esquistossomóticos sem fibrose apresentaram níveis mais elevados dessa citocina quando comparados aos pacientes diagnosticados com FPP avançada. Alves-Oliveira et al. (2006) avaliaram os níveis de produção de algumas citocinas, incluindo o TGF- $\beta$ , em indivíduos com diferentes intensidades de infecção e graus de FPP. Nesse estudo foi demonstrada uma associação negativa entre TGF- $\beta$  com a fibrose, sugerindo que essa citocina

poderia estar associada com a proteção contra a fibrose na esquistossomose, entretanto não foi observado diferença nos níveis séricos entre os grupos de pacientes com fibrose. Além disso, diferentes estudos indicam que o TGF- $\beta$  é uma citocina imunomoduladora, sendo produzida por células T regulatórias, e fornece um efetivo mecanismo de controle da fibrose em associação com a IL-10 (HESSE et al., 2004; KITANI et al., 2003). Kaviratne et al. (2004) examinaram o papel do TGF- $\beta$  na fibrose hepática causada pela infecção com o *S. mansoni*. Eles utilizaram camundongos IL-13<sup>-/-</sup> infectados e mostraram uma quase completa anulação da fibrose, apesar da produção continuada e não reduzida do TGF- $\beta$ . Os resultados desse estudo fornecem evidências de uma via da fibrogênese que é dependente de IL-13, mas independente de TGF- $\beta$ . Nossos resultados fortalecem a hipótese do TGF- $\beta$  como uma citocina protetora no processo fibrogênico, ao mostrar a associação de baixos níveis dessa citocina com a FPP avançada e também como possível marcador biológico para detectar a fibrose hepática severa em pacientes esquistossomóticos.

A contagem de plaquetas no sangue tem sido um importante indicador de gravidade na esquistossomose mansônica, sendo sua redução numérica responsável por aumentar o risco de sangramento e observada por alguns autores tanto relacionada à presença de hipertensão portal (SOUSA et al., 2000) como também à fibrose periportal (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007). No presente estudo, a contagem do número de plaquetas no sangue apresentou ser o marcador biológico mais promissor ao identificar a ausência e presença de FPP leve/moderada e avançada e ao apresentar melhor acurácia diagnóstica em comparação aos outros biomarcadores estudados. Além de apresentar vantagens como baixo custo e facilidade de acesso ao exame pelos pacientes nas áreas endêmicas.

Na esquistossomose mansônica, a USG abdominal é utilizada como “padrão ouro” para o diagnóstico da FPP, entretanto, sua utilização apresenta algumas limitações: baixa sensibilidade nas formas iniciais da doença; necessidade de um examinador treinado para o diagnóstico; variação inter-examinador; procedimento examinador-dependente; não está acessível em todos os centros, principalmente nos menores que estão situados em áreas endêmicas da doença (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007). Para superar as limitações no diagnóstico da fibrose, vários índices com marcadores não invasivos para prever a presença e os diferentes graus de fibrose têm sido propostos (ADAMS et al., 2005; CALÉS et al., 2005; FORNS et al., 2003; POYNARD et al., 2002, 2004, 2005; STERLING et al., 2006; WAI et al., 2003). Infelizmente, nenhum desses índices foi desenvolvido para avaliar a fibrose na esquistossomose mansônica.

Diante disso, o presente estudo foi conduzido para desenvolver um índice biológico para prever fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos. Na análise multivariada, os marcadores biológicos FA e plaquetas foram as variáveis independentes para prever a presença de FPP e os marcadores AH e TGF- $\beta$  foram as variáveis independentes para prever a presença de FPP avançada nos pacientes esquistossomóticos. Para amplificar a diferença dos valores de FA e plaquetas entre os pacientes com e sem FPP e dos níveis séricos de AH e TGF- $\beta$  entre os pacientes sem fibrose dos com FPP avançada, foram desenvolvidos dois índices biológicos, IB<sup>1</sup> e IB<sup>2</sup>, respectivamente.

Nossas observações que a diminuição no número de plaquetas e aumento dos níveis séricos de FA foram associados com a progressão da fibrose são consistentes com estudos anteriores (LAMBERTUCCI; SILVA; ANTUNES, 2007; MORAIS et al., 2010). Como também, AH e TGF- $\beta$  com FPP avançada (ALVES-OLIVEIRA et al., 2006; MARINHO et al., 2010; RICARD-BLUM et al., 1999), o que sustenta suas inclusões nos índices biológicos.

Os IB<sup>1</sup> e o IB<sup>2</sup> apresentaram acurácia significativa em diferenciar pacientes esquistossomóticos com e sem fibrose, e em prever a presença de FPP avançada, com AAC de 0,828 e 0,967, respectivamente. Além disso, os marcadores mostraram significativa AAC quando analisados em conjunto em ambos os índices, como também uma maior correlação com a FPP quando comparados com os marcadores isoladamente. Isto sugere que o uso dos marcadores biológicos (FA, plaquetas, AH e TGF- $\beta$ ,) em conjunto, como índices, é mais preciso do que se usados separadamente.

Usando-se valores abaixo do menor ou acima do maior ponto de corte, uma predição da ausência ou presença de FPP pôde ser feita em 49,2% dos pacientes, diagnosticados pela USG, através do IB<sup>1</sup>. Com VPN de 50% e alta sensibilidade para excluir a presença de fibrose nos pacientes e VPP de 97,8% com boa sensibilidade e alta especificidade para determinar a presença de FPP.

Semelhantemente, uma predição da ausência ou presença de FPP avançada pôde ser feita, através do IB<sup>2</sup>, em 71% dos pacientes diagnosticados com este padrão de fibrose na USG. Apresentando VPN de 94,7% e alta sensibilidade e especificidade para exclusão de presença de FPP avançada e com VPP de 97,1%, boa sensibilidade e alta especificidade para determinar a presença de fibrose avançada.

Apesar dos nossos índices terem sido desenvolvidos para prever a fibrose hepática em pacientes esquistossomóticos, os resultados observados no presente estudo apresentam desempenhos semelhantes com os resultados de outros índices desenvolvidos para avaliar a fibrose em outras doenças hepáticas, como a hepatite C. Poynard et al. (2003) utilizaram os

marcadores  $\alpha_2$ -macroglobulina, haptoglobina,  $\gamma$ -GT, bilirrubina total e apolipoproteína A1 (Fibrotest) mais ALT para formar o Actitest e diferenciar pacientes sem fibrose dos pacientes com fibrose, com AAC igual a 0,73 no grupo de pacientes para a formação do índice. Em outro estudo, um índice constituído da combinação de 4 marcadores (idade,  $\gamma$ -GT, colesterol e plaquetas), apresentou AAC de 0,86 e PV- de 96% para determinar a ausência de fibrose e PV+ de 66% para prever a presença de fibrose no grupo de formação com pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (FORNS et al., 2003). Um índice desenvolvido por Wai et al. (2003), que é o APRI (relação AST/plaquetas), apresentou uma AAC de 0,80 com PV- de 86% para excluir fibrose significativa e PV+ de 88% para prever a presença no grupo de pacientes para a construção do índice. E através do Hepascore (bilirrubina,  $\gamma$ -GT, ácido hialurônico,  $\alpha_2$ -macroglobulina, idade e sexo) foi demonstrada uma AAC de 0,95 com sensibilidade de 95% e especificidade de 81% para determinar a presença de fibrose avançada no grupo de formação (ADAMS et al., 2005). Os nossos índices, tanto para diagnosticar a FPP (IB<sup>1</sup>) como para verificar a presença de FPP avançada (IB<sup>2</sup>) apresentaram desempenho melhor ou semelhante a esses índices, demonstrando serem candidatos potenciais para a aplicação em pacientes esquistossomóticos.

A maior vantagem dos nossos índices é a sua simplicidade. O IB<sup>1</sup> consiste de variáveis objetivas e prontamente disponíveis em laboratório. Tanto contagem de plaquetas no sangue como a FA são testes de rotina mensurados em pacientes infectados pelo *S. mansoni* para analisar o envolvimento hepático, e o IB<sup>2</sup> é composto pelo AH e TGF- $\beta$ , os quais são variáveis que podem ser mensuradas através da técnica de imunoenensaio com *kits* disponíveis comercialmente. Sendo, portanto, a avaliação da FPP através dos índices biológicos propostos, menos dispendiosa e mais conveniente do que a utilização da USG nos pequenos centros de saúde em áreas endêmicas.

Entretanto, nosso estudo apresenta algumas limitações: o estudo foi conduzido com pacientes acompanhados em hospital de referência para os casos mais avançados da doença; os pacientes incluídos na pesquisa já tinham recebido tratamento prévio; não foi possível diferenciar graus intermediários de FPP. Para superar essas limitações, a validação dos índices deverá ser realizada em um grande número de pacientes esquistossomóticos em áreas endêmicas e de outras instituições; comparar o desempenho dos índices em grupo de pacientes tratados e não tratados; além de aplicar o índice também em pacientes com outras doenças hepáticas.

O nosso estudo contribuiu para um maior conhecimento de marcadores biológicos não-invasivos como preditores dos graus de fibrose periportal e apresenta grande valor com a

construção de índices biológicos que possam ser utilizados no acompanhamento dos pacientes esquistossomóticos, principalmente nos pequenos centros de saúde em áreas endêmicas, onde o acesso ao exame de USG é restrito.

A análise do desempenho dos índices biológicos na predição da presença e gravidade da fibrose na esquistossomose mostrou que esses índices têm sensibilidade, especificidade e valores preditivos muito bons. Em um estudo prospectivo realizado em áreas endêmicas e com um maior número de pacientes, a validação dos índices confirmará as suas utilizações como métodos valiosos para a detecção da fibrose nos pacientes esquistossomóticos. A avaliação da presença e gravidade da fibrose na esquistossomose através de um índice biológico ajudará os médicos dos pequenos centros de saúde, localizados em áreas endêmicas da doença, com um diagnóstico mais rápido da fibrose nesses pacientes. O que é essencial na determinação das estratégias de tratamento e no prognóstico, diminuindo o risco potencial para complicações. Com isso, haveria a possibilidade de triagem dos casos mais graves de fibrose periportal, e a decisão de encaminhamento dos pacientes para os hospitais de referência nos grandes centros.

## 11 CONCLUSÕES

- a) De acordo com as AAC, sensibilidades e especificidades,  $\gamma$ -GT, FA e AH foram considerados bons candidatos a marcadores bioquímicos para detectar a fibrose avançada em pacientes com esquistossomose;
- b) Pacientes esquistossomóticos com fibrose avançada apresentam níveis diminuídos da citocina TGF- $\beta$ , com acurácia diagnóstica significativa. O que sugere sua utilização como possível marcador de progressão da fibrose periportal;
- c) As plaquetas mostraram-se como o marcador biológico mais promissor, uma vez que diferenciou os três grupos de fibrose periportal estudados;
- d) Nossos resultados sugerem que os IBs são potenciais candidatos para serem utilizados no processo de validação e posteriormente possam ser utilizados no diagnóstico da presença e gravidade da FPP.

**12 PERSPECTIVAS**

- a) Realizar um estudo prospectivo com um número maior de pacientes em áreas endêmicas para a validação dos índices biológicos;
- b) Realizar um estudo longitudinal para determinar se os índices biológicos são responsivos às mudanças do grau de fibrose no mesmo indivíduo ao longo do tempo;
- c) Avaliar o desempenho dos IB<sup>1</sup> e IB<sup>2</sup> em outras doenças com desenvolvimento de fibrose hepática.

## REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85-91, Sep. 2006.

ADAMS, L. A. et al. Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. Clinical Chemistry, Washington, DC, v. 51, n. 10, p. 1867-1873, Oct. 2005.

ALVES-JUNIOR, A. et al. Hipertensão portal esquistossomótica: influência do fluxo sanguíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 203-208, out./dez. 2003.

ALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* in Humans. Infection and Immunity, Washington, v. 74, n. 2, p. 1215-1221, Feb. 2006.

AMARAL, A. C. C. et al. Elevação da  $\gamma$ -glutamyltransferase sérica na hepatopatia esquistossomótica não se correlaciona com a carga parasitária e precede alterações ultrasonográficas. Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v. 39, n. 1, p.27-31, jan/mar. 2002.

ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. Parasites & Vectors, London, v. 3, n. 60, p. 60-67, Jul. 2010.

BARBOSA, C. S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, supl. 1, p. 55-62, set. 2006.

BARBOSA, C. S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.105, n.4, p. 549-554, jul. 2010.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. The Journal of Clinical Investigation, Michigan, v. 155, n. 2, p. 209-218, Feb. 2005.

BICHLER, K. H. et al. Schistosomiasis: a critical review. Current Opinion in Urology, Philadelphia, v. 11, p. 97-101, Jan. 2001.

BISSELL, D. M.; ROULOT, D.; GEORGE, J. Transforming growth factor beta and the liver. Hepatology, Baltimore, v. 34, n. 5, p. 859-67, Nov. 2001.

BOOTH, M. et al. Periportal Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection Is Associated with Low IL-10, Low IFN- $\gamma$ , High TNF- $\alpha$ , or Low RANTES, Depending on Age and Gender. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 172, p. 1295-1303, Jan. 2004.

BRANDT, C. T. et al. Evaluation of the cytokines IL-10 and IL-13 as mediators in the progression of symmers fibrosis in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Rio de Janeiro, v. 37, n. 5, p. 333-337, out. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose. In: \_\_\_\_\_. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília, DF, 2007. p. 297-306. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

\_\_\_\_\_. Relatório de Situação: Pernambuco. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno\\_pe\\_2007.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_pe_2007.pdf)> Acesso em: 15 dez. 2009.

BUCHARD, G. D. et al. *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in Senegal: lack of correlation between liver morphology in ultrasound and connective tissue metabolites in serum. Tropical Medicine & International Health, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-241, Mar. 1998.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. Parasite Immunology, Oxford, v. 31, n. 4, p. 163-176, Apr. 2009.

CAIRO WORKING GROUP. The use of diagnostic ultrasound in schistosomiasis – attempts at standardization of methodology. Acta Tropica, Basel, v. 51, n. 1, p. 45-63, May. 1992.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic of the infectio. Acta Tropica, Basel, v. 108, p. 109-117, Jun. 2008.

CALÈS, P. et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. Hepatology, Baltimore, v. 42, p. 1373-1381, Dec. 2005.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine Schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. Hepatology, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 273-282, Aug. 2001.

- CHIAVAROLI, R.; GRIMA, P.; GRIMA, P. Detection of early liver fibrosis in patients with intestinal schistosomiasis: sonographic and histologic findings in *Schistosoma mansoni* infection. Infection, German, v. 36, p. 585-589, Nov. 2008.
- CLEVA, R. et al. Portal Hyperflow in patients with hepatosplenic mansonic schistosomiasis. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 10-14, jan. 2004.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, supl. 1, p. 13-19, out. 2004.
- COUTO, J.L. et al. Liver function abnormalities in undernourished and *Schistosoma mansoni*-infected mice. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 41, n. 4, p. 390-393, jul/aug. 2008.
- daSILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. Schistosomiasis mansoni – clinical features. Journal of Gastroenterology and Hepatology, Melbourne, v. 28, n. 1, p. 30-39, Jan. 2005.
- deJESUS, A. R. et al. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. Infection and Immunity, Washington, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, Jun. 2004.
- DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A.; Dantas, W. Conferência de Hepatologia, São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2001, p. 391-405.
- DOMINGUES, A. L. C. Diagnóstico por imagem. In: CARVALHO, O. S (Org.). Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 929-961.
- ESPIRITO SANTO, M. C. C. et al. Abdominal Ultrasound in the Evaluation of Fibrosis and Portal Hypertension in na Area of Schistosomiasis Low Endemicity. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 117-119, mar./apr. 2008.
- FALLON, P. G. et al. Schistosome Infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 164, p. 2585-2591, Mar. 2000.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 34, n. 6, p. 569-576, Nov./dez. 2001.

FAVRE, T. C. et al. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, supl. 1, p. 73-78, set. 2006.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. Revista de Patologia Tropical, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 67-74, jan./abr. 2007.

FRIEDMAN, S. L.; PHAIR, J. P. Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. Hepatitis Annual Update, Reston, p. 13-39, 2003.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. Gastroenterology, Baltimore, v. 134, p. 1655-69, May. 2008.

FORNS, X. et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. Hepatology, Baltimore, v. 36, p. 986-992, Oct. 2002.

GRESSNER, O. A; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clinica Chimica Acta, San Francisco, v. 38, p. 107-113, Feb. 2007.

GRIGORESCU, M. et al. The Fibrotest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The romanian experience. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, Romania, v. 16, n. 1, p. 31-37, Mar. 2007.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. Lancet, London, v. 368, p. 1106-18, Sep. 2006.

HESSE, M. et al. Differential regulation of oxide nitric synthase-2 and arginase-1 by Type 1/Type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. Journal of Immunology, Baltimore, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, Dec. 2001.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. Journal of Immunology, Baltimore, v. 172, p. 3157-3166, Mar. 2004.

HENRI, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 169, n. 2, p. 929-936, Jul. 2002.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and Danger of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, Jun. 2000.

JANEWAY, C. A (Org.). Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JIAO, J.; FRIEDMAN, S.L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 223-29, May. 2009.

KARDORFF, R. et al. *Schistosoma mansoni*-related morbidity on Ukerewe Island, Tanzania: clinical, ultrasonographical and biochemical parameters. Tropical Medicine & International Health, Oxford, v. 2, n. 3, p. 230-239, Mar. 1997.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 33, n. 3, p. 303-308, maio/jun. 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43, jan./mar. 2003.

KAVIRATNE, M. et al. IL-13 Activates a Mechanism of Tissue Fibrosis That Is Completely TGF- $\beta$  Independent. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 173, n. 6, p. 4020-4029, Sep. 2004.

KITANI, A. et al. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- $\beta$ 1-mediated fibrosis. The Journal of Experimental Medicine, New York, v. 198, p. 1179-1188, Oct. 2003.

KÖPKE-AGUIAR, L. A. et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to access severity of liver disease in schistosomiasis. Acta Tropica, Basel, v. 84, n. 2, p. 117-126, Nov. 2002.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; ANTUNES, C. M. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index and blood platelet count are good markers for fibrosis evaluation in schistosomiasis mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 40, n. 5, p. 599, set./out. 2007.

LEE, C. G. et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta (1). The Journal of Experimental Medicine, New York, v. 194, n. 6, p. 809-21, Sep. 2001.

LEROY, V. Other non-invasive markers of liver fibrosis. Gastroenterologie Clinique et Biologique, Paris, v. 32, n. 6, Suppl I, p. 52-57, Sep. 2008.

MACHADO, M. M. et al. Aspectos ultra-sonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. Radiologia Brasileira, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 41-45, 2002.

MAGALHÃES, A. et al. Cytokine Profile Associated with Human Chronic Schistosomiasis Mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, supl. 1, p. 21-26, ago. 2004.

MANZELLA, A. et al. Schistosomiasis of the liver. Abdominal Imaging, New York, v. 33, n. 2, p. 144-150, Mar./Apr. 2008.

MARINHO, C. C. et al. Serum hyaluronan and collagen IV as non-invasive markers of liver fibrosis in patients from an endemic area for schistosomiasis mansoni: a field-based study in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 471-78, jul. 2010.

MARTINS, J. R. M. et al. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. Analytical Biochemistry, Bethesda, v. 319, n. 1, p. 65-72, Aug. 2003.

MELO, A.L.; COELHO, P. M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P. (Org.). Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 193-212.

MELTZER, E. et al. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 12, n. 11, p. 1096-1700, Nov. 2006.

MESQUITA, G. V. et al. Avaliação de pacientes esquistossomóticos quanto ao conteúdo mineral ósseo, nível de magnésio corporal total e atividade da enzima lecitina: colesterol acetiltransferase em pós-esplenectomizados com auto-implante esplênico. Revista Brasileira de Ortopedia, São Paulo, v. 39, n. 1/2, p. 49-58, jan./fev. 2004.

MORAIS, C. N. L.; et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568, set. 2008.

MORAIS, C. N. L. et al. Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n.4, p. 460-66, jul. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Schistosomiasis. Geneva, Jul. 2007. (Fact sheet n. 115). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>> Acesso em: 25 jan. 2010.

PARSIAN, H. et al. Serum Hyaluronic Acid and Laminin as Biomarkers in Liver Fibrosis. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, Romenia, v. 19, n. 2, p. 169-174, Jun, 2010.

PEARCE, E. J.; MacDONALD, A. S. The Immunobiology of schistosomiasis. Nature Reviews Immunology, London, v. 2, n. 7, p. 499-511, Jul. 2002.

PETRIANU, A.; OLIVEIRA, A. E.; ALBERTI, L. R. “Hiperesplenismo” em hipertensão porta por esquistossomose mansônica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 195-201, 2004.

PORDEUS, L. C. et al.. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, DF, v. 17, n. 3, p. 163-175, jul./set. 2008.

POYNARD, T. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. Journal of Viral Hepatitis, Oxford, v. 9, p. 128-133, Mar. 2002.

POYNARD, T. et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. Hepatology, Baltimore, v. 38, p. 481-492, Aug. 2003.

POYNARD, T. et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. Clinical Chemistry, New York, v. 50, p. 1344-1355, Aug. 2004.

POYNARD, T. et al. FibroTest-FibroSURE: towards a universal biomarkers of liver fibrosis? Expert Review of Molecular Diagnostics, London, v. 5, p. 15-21, Jan. 2005.

REIMAN, R. M. et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. Infection and Immunity, Washington, v. 74, n. 3, p. 1471-1479, Mar. 2006.

RESENDES, A. P. C.; SOUZA, S. R.; BARBOSA, C. S. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1392 - 1401, set./out. 2005.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RICARD-BLUM, S. et al. Relationships between several markers of extracellular matrix turnover and ultrasonography in human schistosomiasis mansoni. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 60, p. 658-663, Apr. 1999.

RICHTER, J. et al. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-56, set. 2001.

SANTOS, G. T. et al. Reprodutibilidade da Classificação Ultra-sonográfica de Niamey na Avaliação da Fibrose Periportal na Esquistossomose Mansônica. Radiologia Brasileira, São Paulo, v. 40, n.6, p. 377-381, nov./dez. 2007.

SEBASTIANI, G.; GKOUVATSOS, K.; PLEBANI, M. Non-invasive assessment of liver fibrosis: it is time for laboratory medicine. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, New York, v. 49, n. 1, p. 13-32, Jan. 2011.

SCHNACK, F. J. et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1205-1208, jul./ago. 2003.

SOARES, S. et al. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 40, n. 3, p. 321-325, maio/jun. 2007.

SOUZA, M. R.; TOLEDO, C. F.; BORGES, D. R. Trombocytomia as a predictor of portal hypertension in schistosomiasis. Digestive Diseases and Sciences, New York, v. 45, n. 10, p. 1964-1970, Oct. 2000.

STAVITSKY, A.B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. Infection and Immunity, Washington, v. 72, n.1, p. 1-12, Jan. 2004.

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

TALAAT, R. et al. Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S. mansoni*-infected Egyptian patients. Parasitology Research, Germany, v. 101, p. 289-299, Jul. 2007.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Cytokines, chemokine receptors, CD4 (+) CD 25 (HIGH+) T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. Acta Tropica, Basel, v. 108, p. 139-149, Nov./Dec. 2008.

THULUVATH, J. P.; KROK, K. L. Noninvasive markers of fibrosis for longitudinal assessment of fibrosis in chronic liver disease: are they ready for prime time? American Journal of Gastroenterology, New York, v. 101, p. 1497-1499, Jul. 2006.

WAY, C. T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology, Baltimore, v. 38, p. 518-526, Aug. 2003.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. Immunology and Cell Biology, Canberra, v. 85, p. 148-154, Dec. 2007.

WYNN, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. The Journal of Clinical Investigation, Michigan, v. 117, n. 3, p. 524-29, Mar. 2007.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes Esquistossomóticos



Centro de Pesquisas  
**AGGEU MAGALHÃES**



Ministério da Saúde

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que aceito participar do estudo científico: “AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA ATRAVÉS DE MARCADORES BIOLÓGICOS”. Foi-me explicado que faz parte de minha participação neste estudo um exame médico completo, exames de sangue, ultrassonográficos e parasitológicos de fezes. Os riscos de retirar sangue são dor e hematoma no local, e muito raramente, pode ocorrer desmaio. A quantidade de sangue a ser retirada será cerca de 3 colheres de chá (15ml) e não deve causar problemas para a minha saúde. Minha participação neste estudo não vai me beneficiar diretamente, mas poderá ajudar a entender melhor essa doença. Essa participação é voluntária e eu poderei deixar este estudo a qualquer momento se assim desejar. Os materiais biológicos obtidos nesse projeto, serão arquivados em um banco de amostras, podendo ser utilizados em estudos relacionados a imunologia e bioquímica. Caso não queira participar, minha decisão não vai mudar meu atendimento médico ou tratamento neste hospital ou clínica agora ou no futuro. Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Esse termo de consentimento será feito em duas vias para que uma delas permaneça comigo. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com qualquer um das pessoas da equipe médica a qualquer momento pessoalmente ou pelos telefones abaixo:

Dra. Silvia Montenegro. Fone: 2101-2565

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Dra. Ana Lúcia Coutinho. Fone: 3227-0927/ 9272-0218

Recife, de de 2010

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável  
Ana Virgínia Matos Sá Barreto  
Mestranda do Curso de Saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ  
Telefone para contato: 2101-2561

## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo Saudável



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDIVÍDUO SAUDÁVEL

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que aceito participar do estudo científico: “AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA ATRAVÉS DE MARCADORES BIOLÓGICOS”. Foi-me explicado que faz parte de minha participação neste estudo um exame médico completo, exames de sangue e parasitológicos de fezes. Os riscos de retirar sangue são dor e hematoma no local, e muito raramente, pode ocorrer desmaio. A quantidade de sangue a ser retirada será cerca de 3 colheres de chá (15ml) e não deve causar problemas para a minha saúde. Minha participação neste estudo não vai me beneficiar diretamente, mas poderá ajudar a entender melhor essa doença. Essa participação é voluntária e eu poderei deixar este estudo a qualquer momento se assim desejar. Os materiais biológicos obtidos nesse projeto, serão arquivados em um banco de amostras, podendo ser utilizados em estudos relacionados a imunologia e bioquímica. Caso não queira participar, minha decisão não vai mudar meu atendimento médico ou tratamento neste hospital ou clínica agora ou no futuro. Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Esse termo de consentimento será feito em duas vias para que uma delas permaneça comigo. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com qualquer um das pessoas da equipe médica a qualquer momento pessoalmente ou pelos telefones abaixo:

Dra. Silvia Montenegro. Fone: 2101-2565

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Dra. Ana Lúcia Coutinho. Fone: 3227-0927/ 9272-0218

Recife, de de 2010

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável  
Ana Virgínia Matos Sá Barreto  
Mestranda do Curso de Saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ  
Telefone para contato: 2101-2561

## APÊNDICE C – Questionário de Pesquisa

Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES

Ministério da Saúde

FICHA DE PACIENTES DO AMBULATÓRIO - HC  
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA

- 1) nº do prontuário do HC: \_\_\_\_\_
- 2) Nome do paciente: \_\_\_\_\_
- 3) Idade: \_\_\_\_\_ 4) Sexo: \_\_\_\_\_
- 5) Endereço: \_\_\_\_\_
- 6) Telefone para contato: \_\_\_\_\_
- 7) Histórico Epidemiológico:  
Banho de rio: sim ( ) não ( )  
Quando? \_\_\_\_\_  
Onde? \_\_\_\_\_  
Cidade de origem: \_\_\_\_\_
- 8) Doença:  
Esquistossomose: sim ( ) não ( )  
Hepatoesplênica: sim ( ) não ( )  
Tratamento: sim ( ) não ( ) Data: \_\_\_\_\_
- 9) Parasitológico de fezes:  
Hoffman: \_\_\_\_\_  
Kato-Katz: \_\_\_\_\_
- 10) Ultrassonografia:  
Grau de fibrose:  
Cairo: \_\_\_\_\_ Niamey: \_\_\_\_\_  
Média de fibrose: \_\_\_\_\_  
Baço longitudinal: \_\_\_\_\_  
Veia Porta: \_\_\_\_\_



## ANEXO A – Parecer do CEP – CPqAM/FIOCRUZ



**Título do Projeto:** “Associação entre marcadores biológicos com graus de fibrose hepática e atividade inflamatória no complexo hepatite C e esquistossomose”.

**Pesquisador responsável:** Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 26/12/2003

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 44/03

**Registro no CAAE:** s/n

## RENOVAÇÃO DE PARECER

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 02 de junho de 2013.

Recife, 14 de junho de 2010.

  
 Rafael da Silveira Moreira  
Cirurgião Dentista  
Vice-Coordenador  
Mat. SIAPE 1635510  
CPqam / FIOCRUZ