

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

IZABELA VOIETA DA SILVA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES SÉRICOS - ÁCIDO HIALURÔNICO (AH), YKL
40 E FATOR DE CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO β 1 (TGF- β 1) - NO
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA**

**Belo Horizonte, Minas Gerais
Brasil
2012**

IZABELA VOIETA DA SILVA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES SÉRICOS - ÁCIDO HIALURÔNICO (AH), YKL
40 E FATOR DE CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO β 1 (TGF- β 1) - NO
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA**

**Tese de Doutorado apresentada ao curso de
Pós-graduação da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais para
obtenção do título de Doutor em Infectologia e
Medicina tropical**

**Área de concentração: Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

**Orientador: Prof. José Roberto Lambertucci
Co-orientador: Prof. Carlos Maurício de
Figueiredo Antunes
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2012**

T266a Teixeira, Izabela Voieta da Silva.
Avaliação dos marcadores séricos – ácido hialurônico (AH), YKL 40 e fator de crescimento e transformação β1 (TGF-β1) – no diagnóstico da Esquistossomose mansônica hepatoesplênica [manuscrito]. / Izabela Voieta da Silva Teixeira. -- Belo Horizonte: 2012. 117f.: il.

Orientador: José Roberto Lambertucci.
Co-Orientador: Carlos Mauricio de Figueiredo Antunes.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Cirrose Hepática/ultrassonografia. 3. Marcadores Biológicos. 4. Ácido Hialurônico. 5. Fator de Crescimento Transformador beta1. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Lambertucci, José Roberto. II. Antunes, Carlos Mauricio de Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 810

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: José Roberto Lambertucci, Carlos Maurício de Figueiredo Antunes, Vivian Resende, Fernando Antônio Botoni, Fausto Edmundo Lima Pereira e Márcia Maria de Souza, aprovou a defesa de tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DOS MARCADORES SÉRICOS – ÁCIDO HIALURÔNICO, YKL-40 E FATOR DE CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO (TGF- β 1) – PARA O DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI”** apresentada pela doutoranda **IZABELA VOIETA DA SILVA TEIXEIRA** para obtenção do título de Doutora em Medicina, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 02 de março de 2012.

Prof. José Roberto Lambertucci
Orientador

Prof. Carlos Maurício de Figueiredo Antunes
Coorientador

Profa. Vivian Resende

Prof. Fernando Antônio Botoni

Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira

Profa. Márcia Maria de Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Profa. Rocksane de Carvalho Norton

Pró Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Profa. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof. Anelise Impelziere Nogueira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Sub Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Ricardo de Amorim Corrêa

Stella Sala Soares Lima (Disc. Titular)

Aos pequenos Bruno Voieta e Gabriela Voieta

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Roberto Lambertucci que dentre tantas lições inesquecíveis mostrou-me o verdadeiro significado da palavra entusiasmo e de sua importância em nossas vidas.

Ao Prof. Carlos Maurício pelos ensinamentos, pelas palavras de sabedoria, conforto e pela gostosa convivência ao longo desses anos.

À Professora Vivian Resende pelo carinho com nosso trabalho e principalmente com os nossos pacientes.

Ao Professor Zilton Andrade e à Professora Sonia Andrade pela oportunidade de conviver com o ambiente de pesquisa na Fiocruz e com a história construída em conjunto por vocês.

Aos Profs. Andy Petroianu e Antonio Lucio pela colaboração.

À equipe da Fundação Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador-Bahia. Obrigada pela acolhida, gentileza e colaboração, especialmente Márcia Maria, Ana Cristina Gonzales, Elisângela Trindade, Thiago Pereira e Claudio Pereira Figueira

Aos imaginologistas Luciene Mota e Leonardo Queiroz por todo o trabalho desempenhado durante minha formação.

Fernando Biscione e Graziela pelas contribuições na avaliação dos resultados.

À amiga Alba Otoni pela cumplicidade, carinho e dedicação em todos os momentos. Nossa parceria foi preciosa!

Às colegas Luciana Cristina e Carolina Marinho pela inspiração e aos colegas Silvio Roberto e Frederico Amâncio pelas contribuições ao longo do trabalho.

Aos colegas Sandra Drummond, Pedro Prata, Juliana Papatella, Vinicius, Bruna, Carla, Silvana Romano pelos bons momentos vividos nas reuniões de quarta-feira e fora delas.

Aos colegas do SEPADI- Betim, Hospital Eduardo de Menezes - FHEMIG, especialmente ao amigo Ricardo Fontes pelo mundo além tese.

À Maurina pela atenção e cuidado todos esses anos.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Angela, meu maior presente.

Aos meus irmãos, Fabricia e Leonardo, pelo respeito às minhas escolhas.

Ao Leo, por vivenciar meu crescimento e crescer comigo.

O IMPOSSÍVEL ACONTECE

O Messias nasceu de uma Virgem (Jesus).

O grande pensador grego (Sócrates) nunca escreveu um livro.

A *Nona Sinfonia* é fruto de um homem surdo (Beethoven).

Na Biblioteca de Babel o leitor era um poeta cego (Jorge Luis Borges).

O cientista que afirmou que “tudo é relativo” fez uma afirmação absoluta (Einstein).

E não tinha mãos o homem que fez as mais belas esculturas do meu país (Aleijadinho).

Affonso Romano de Sant'anna

RESUMO

Introdução: Biomarcadores séricos têm sido usados no diagnóstico e avaliação da intensidade da fibrose na esquistossomose hepatoesplênica com resultados variados. Poucos estudos usaram a biópsia hepática na confirmação da presença de fibrose de *Symmers* e mais frequentemente utilizaram-se métodos de imagem como padrão ouro. **Objetivo:** Avaliamos neste estudo o papel do ácido hialurônico (AH), do YKL40 e do fator de crescimento e transformação $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) no diagnóstico da esquistossomose mansônica hepatoesplênica e na avaliação da intensidade da fibrose hepática utilizando métodos de imagem e biópsia hepática cirúrgica. **Metodologia:** Sessenta pacientes com esquistossomose mansônica foram selecionados para o estudo. Trinta (Grupo 1) tinham esquistossomose hepatoesplênica e frequentavam o ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMG (estes pacientes não tinham evidência de infecção ativa pelo *S. mansoni*); 23 eram homens (76,7%), com média de idade de 39,2 anos ($\pm 9,7$). Outros 30 pacientes tinham esquistossomose hepatointestinal (Grupo 2) e eram provenientes de área endêmica de esquistossomose (ovos viáveis nas fezes); 15 eram homens (50%), com média de idade de 35,5 anos ($\pm 12,7$). Todos foram submetidos a exame clínico, ultrassonografia abdominal e coleta de sangue para a realização dos marcadores séricos de fibrose. Os hepatoesplênicos (Grupo 1) submeteram-se a outros exames, como: marcadores sorológicos de hepatites B e C, endoscopia digestiva alta, ressonância magnética do abdome e biópsia hepática em cunha durante o ato cirúrgico para tratamento de hipertensão porta. Os marcadores séricos foram dosados pelo método de ELISA utilizando kits comerciais. Para a ultrassonografia usou-se o aparelho ALOKA SSD 1700 *Dynaview* e para a ressonância magnética o aparelho da *General Electric* (GE) 1.5 tesla. Os fragmentos de fígado obtidos durante a cirurgia foram conservados em formol a 10% e a seguir emblocados em parafina. Os cortes de 5 μ m (micrômetros) corados pela HE foram analisados à microscopia de luz. Para a histomorfometria usou-se o corante picrossírius vermelho e as áreas examinadas foram quantificadas usando-se o *software Image-Pro-Plus*. Os dados obtidos foram armazenados no programa EpiData 3.0 e analisados pelo *software R Project for Statistical Computing*, versão 2.14.0. **Resultados:** O ácido hialurônico (AH) e o YKL40 não tiveram valor no diagnóstico da fibrose hepática da esquistossomose (não separaram os hepatoesplênicos dos hepatointestinais), quando comparados aos métodos de imagem. A distribuição dos valores de TGF- $\beta 1$ foi maior no grupo de pacientes com esquistossomose hepatointestinal ($p= 0,0001$). A classificação da intensidade da fibrose hepática na histologia não coincidiu com os valores séricos dos marcadores avaliados neste estudo. Observou-se correlação moderada dos níveis séricos de AH com a histomorfometria ($p= 0,006$). Houve boa concordância entre os métodos de imagem e a biópsia hepática na classificação da intensidade da fibrose. **Conclusões:** O ácido hialurônico e o YKL40 não separaram os pacientes com fibrose dos pacientes sem fibrose hepática. O TGF- $\beta 1$ não teve importância como marcador de fibrose hepática nos hepatoesplênicos, mas apresentou níveis séricos significativamente mais elevados nos pacientes com esquistossomose hepatointestinal. Isso sugere que ele seja marcador de infecção ativa pelo *S. mansoni*. Os marcadores usados neste estudo não foram importantes na classificação da intensidade da fibrose hepática esquistossomótica.

Palavras-chave: marcadores de fibrose, ácido hialurônico, YKL40, TGF- $\beta 1$, fibrose hepática, esquistossomose

ABSTRACT

Introduction: Serum biomarkers have been used as a tool in the diagnosis and evaluation of liver fibrosis intensity in hepatosplenic schistosomiasis with variable results. Few studies have used liver biopsy in the confirmation of Symmers' fibrosis and more frequently physicians rely upon imaging techniques as gold standard in the evaluation of liver fibrosis severity. **Objective:** Herein we evaluated the importance of hyaluronic acid (HA), YKL-40 and transforming growth factor Beta1 (TGF- β 1) in the diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis and in the evaluation of liver fibrosis intensity using imaging techniques and surgical wedge liver biopsy. **Methodology:** Sixty patients with schistosomiasis mansoni were selected for this study. Thirty (Group 1) had hepatosplenic schistosomiasis and they were attending the Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias, UFMG (patients, in this group, had no evidence of active *Schistosoma mansoni* infection); 23 were male (76.7%) in the mean age of 39.2 years (\pm 9.7). Another 30 patients had hepatointestinal schistosomiasis (Group 2) and they came from endemic areas of Minas Gerais (with viable eggs in the stool); 15 were male (50.0%), mean age of 35.5 years (\pm 12.7). All patients were submitted to clinical examination and abdominal ultrasound; a blood sample was collected and stored for further analysis. The hepatosplenic group was submitted to other tests, such as: serology for hepatitis B and C, upper digestive endoscopy, abdominal magnetic resonance and surgical liver wedge biopsy. The serum markers of fibrosis were measured using commercial kits. For ultrasound an ALOKA SSD 1700 Dynaview apparatus was used and for magnetic resonance a GE 1.5 tesla instrument. Liver fragments obtained during surgery were fixed in 10% buffered formalin and afterwards embedded in paraffin wax. Five μ m (micrometers) slices were stained using Hematoxylin-Eosin and examined under light microscopy. Other fragments were stained with Picrosirius red and portal tracts were selected by the examiner and quantified by the software Image-Pro-Plus. Collected data were stored in EpiData 3.1 and the software R Project for Statistical Computing, 2.14.0 version was used for statistical analysis. **Results:** Both hyaluronic acid and YKL40 had no value in the diagnosis of liver fibrosis (they did not separate patients with hepatosplenic from hepatointestinal schistosomiasis) when imaging techniques were used for liver fibrosis identification. Serum levels of TGF-B1 were higher in the sera of patients with hepatointestinal schistosomiasis compared to patients with the hepatosplenic form of the disease. Intensity of liver fibrosis classified by histology did not coincide with serum levels of the biomarkers evaluated in this study. There was moderate correlation between serum levels of hyaluronic acid when it was compared to histomorphometry ($p=0.006$). There was a good concordance between imaging techniques and liver biopsy in the classification of liver fibrosis intensity. **Conclusions:** Hyaluronic acid and YKL40 were not useful as a marker of liver fibrosis in our study. TGF- β 1, also, was not a good marker of liver fibrosis but its serum levels were significantly higher in patients with hepatointestinal schistosomiasis as compared to hepatosplenics. Therefore, TGF- β 1 may be a marker of active *S. mansoni* infection. The biomarkers used in the present study were not important in classifying schistosomiasis liver fibrosis severity.

Key-words: biomarkers of liver fibrosis, hyaluronic acid, YKL40, TGF- β 1, liver fibrosis, schistosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
FIGURA 2 -	Grandes espaços porta, que aparecem como manchas brancas circundadas por parênquima hepático normal, lembrando hastes de cachimbo de porcelana (<i>clay-pipestem cirrhosis</i>).....	22
FIGURA 3 -	Bocelamento da superfície do fígado.....	23
FIGURA 4 -	Alterações do sistema vascular hepático observadas em fígado humano de paciente com esquistossomose avançada após injeção de acetato de vinil e corrosão tecidual.....	29
FIGURA 5 -	Modelo em vinil plástico demonstra a veia porta de modelo experimental normal e infectado com cercárias evidenciando a amputação das ramificações vasculares.....	29
FIGURA 6 -	Fluxograma do estudo dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica realizado no período de julho de 2006 a julho de 2010, Belo Horizonte – MG.....	56
FIGURA 7 -	Adaptação dos padrões ultrassonográficos de imagem hepática para RM.....	61
FIGURA 8 -	Aspecto macroscópico do fígado e realização de biópsia hepática.....	62
FIGURA 9 -	Avaliação histológica realizada no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Biópsia hepática corada com HE.....	63
FIGURA 10 -	Biópsia hepática em lâmina histológica. Coloração Picrosírius vermelho – 10x. Fibrose hepática corada de vermelho.....	64
GRÁFICO 1 -	Curva ROC 1- Avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e nível sérico de AH; curva ROC 2- Avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e nível sérico YKL40 ; curva ROC 3- Avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e TGF- β 1.....	73
GRÁFICO 2 -	Análise da correlação entre a histomorfometria e os marcadores não invasivos de fibrose (AH, TGF- β 1, YKL40).....	74
GRÁFICO 3 -	Curvas ROC: Curva 1 - nível sérico de AH e avaliação da fibrose por ultrassonografia; curva 2 - nível sérico de TGF- β 1 na avaliação da fibrose por ultrassonografia; curva 3 – nível sérico de YKL 40 e avaliação da fibrose por ultrassonografia.....	75
GRÁFICO 4 -	Curvas ROC: Curva 1- nível sérico de AH e avaliação da intensidade da fibrose por RM; Curva 2 - nível sérico de TGF- β 1 na avaliação da intensidade da fibrose por RM; curva 3 – nível sérico de YKL 40 e avaliação da intensidade da fibrose por RM.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Valores de IMC e plaquetas de 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica e 30 pacientes com esquistossomose hepatointestinal avaliados neste estudo no período de julho de 2006 a julho de 2010.....	68
TABELA 2 -	Características dos marcadores séricos de fibrose dos 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica e sua relação com a intensidade da fibrose hepática avaliada pela ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática – Faculdade de Medicina – UFMG, período de julho de 2006 a julho de 2010.....	69
TABELA 3 -	Comparação entre as medianas dos valores de marcadores não invasivos de fibrose (AH, TGF- β 1 e YKL40) nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e hepatointestinal avaliados no período de julho de 2006 a julho de 2010.....	71
TABELA 4 -	Regressão logística univariada e regressão logística múltipla dos 60 indivíduos avaliados no período de julho de 2006 a julho de 2010.....	72
TABELA 5 -	Resultado da avaliação da concordância entre os métodos de avaliação da intensidade da fibrose ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
anti-SEA	<i>Soluble egg antigen</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEH	Célula estrelada hepática
C-I	Colágeno tipo I
C-IV	Colágeno tipo IV
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência – Doenças Infecciosas e Parasitárias
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
EHI	Esquistossomose hepatointestinal
ELF	Fibrose hepática européia
EPF	Exame parasitológico de fezes
ET-1	Endotelina 1
FA	Fosfatase alcalina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GGT	γ -glutamil transferase
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HC-gp39	Proteína 1 quitinase humana
HE	Hematoxilina eosina
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL-10	Interleucina 10
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IMC	Índice de massa corporal
KPa	Kilopascal
LAVA	<i>Liver Acquisition with Volume Acceleration</i>
LDH	Desidrogenase láctica
MHz	<i>Mega Hertz</i>
MEC	Matriz Extracelular

MMP	Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleadas do sangue
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PICP	Procolágeno I peptídeo carboxi terminal
PIIINP	Procolágeno III peptídeo amino terminal
RM	Ressonância magnética
SEA	Antígeno solúvel do ovo
SWAP	Pesquisa de anticorpos específicos contra antígeno de <i>S mansoni</i>
TC	Tomografia computadorizada
TE	Tempo de eco
TGF- β 1	Fator de crescimento e transformação β 1
Th1	Células auxiliares 1
Th2	Células auxiliares 2
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TR	Tempo de repetição
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
US	Ultrassonografia
WHO	World Health Organization
YKL40	Glicoproteína de 39 KD

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Aspectos gerais da esquistossomose	21
2.2	Morfologia hepática em esquistossomose	25
2.2.1	Granuloma esquistossomótico periovular	26
2.2.2	Fibrose periportal	27
2.2.3	Alterações vasculares	27
2.2.4	Angiogênese e esquistossomose	30
2.2.5	Regressão da fibrose esquistossomótica	32
2.3	Fibrogênese hepática	33
2.4	Avaliação da fibrose hepática esquistossomótica utilizando métodos de imagem	36
2.5	Marcadores não invasivos de fibrose hepática em esquistossomose	39
2.5.1	Marcadores diretos da fibrogênese hepática	41
2.5.2	Marcadores de interesse	41
2.5.2.1	Ácido Hialurônico	41
2.5.2.2	YKL 40	43
2.5.2.3	TGF- β 1	43
2.5.3	Estudos de marcadores não invasivos de fibrose hepática em esquistossomose	44
2.5.3.1	Estudos envolvendo o AH	44
2.5.3.2	Estudos envolvendo o TGF- β 1	47
2.5.3.3	Estudos envolvendo YKL40 e TGF- β 1	50
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	PACIENTES E MÉTODOS	53
4.1	Protocolo do estudo	53
4.2	Cálculo da amostra	53

4.3	Pacientes	53
4.3.1	Critérios de inclusão	54
4.3.2	Critérios de exclusão	55
4.3.3	História clínica	57
4.3.4	Exame físico	57
4.4	Exames laboratoriais	57
4.5	Exames de imagem	58
4.6	Cirurgia	62
4.7	Biópsia hepática	62
4.7.1	Análise histológica	63
4.7.2	Análise histomorfométrica	64
4.8	Dosagem dos marcadores séricos	65
4.9	Análise estatística	65
4.10	Considerações éticas	66
5	RESULTADOS	67
5.1	Análise descritiva	67
5.1.1	Características dos pacientes	67
5.1.2	Marcadores de fibrose	67
5.1.3	Aspecto macroscópico do fígado dos pacientes com hipertensão porta esquistossomótica durante ato cirúrgico	70
5.1.4	Aspectos histológicos do fígado dos pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica	70
5.2	Comparação entre as medianas dos valores de marcadores não invasivos entre os grupos de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e esquistossomose hepatointestinal	70
5.3	Análise univariada e Análise múltipla	71
5.4	Curvas ROC – marcadores séricos e biópsia hepática	72
5.5	Análise da correlação entre a histomorfometria e os marcadores não invasivos	73
5.6	Curvas ROC – Marcadores séricos e US	74
5.7	Curvas ROC – Marcadores séricos e RM	75
5.8	Análise da concordância entre os três métodos	77

5.9	Análise da concordância 2 a 2 entre os métodos na classificação da intensidade da fibrose	77
6	DISCUSSÃO	78
6.1	Ácido hialurônico, YKL40 e TGF- β 1 no diagnóstico da presença de fibrose periportal	78
6.2	Ácido hialurônico, YKL40 e TGF- β 1 na avaliação da intensidade da fibrose classificada pela biópsia hepática e pelos métodos de imagem	80
6.3	Análise da concordância entre os três métodos (ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática) no diagnóstico da fibrose hepática	81
6.4	Análise da concordância 2 a 2 entre os métodos na classificação da intensidade da fibrose em ausente/leve versus moderada/intensa nos 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica	82
6.5	A biópsia hepática como padrão ouro.	82
6.6	Comentários derivados do estudo	83
7	CONCLUSÕES	84
8	PROPOSIÇÕES	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	ANEXOS	104
	APÊNDICES	107

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose foi descrita no Brasil por Pirajá da Silva em 1908 e é até os dias atuais considerada importante problema de saúde pública devido a sua extensa área de transmissão. O número de portadores da parasitose, casos graves (hepatoesplênica, neuroesquistossomose, forma aguda, abscesso hepático, glomerulonefrite, hipertensão pulmonar entre outras) e mortes causadas pela doença representam um impacto na economia de países em desenvolvimento (LAMBERTUCCI *et al*, 2007).

A transmissão da esquistossomose persiste em várias regiões do Brasil. A doença acomete cerca de seis milhões de pessoas sendo que um número significativo evoluiu para formas graves. Cerca de 25 milhões de pessoas vivem em área de risco de infecção (WHO, 2008).

O padrão ouro na avaliação da fibrose hepática em esquistossomose é a biópsia hepática em cunha obtida durante o ato cirúrgico. A biópsia percutânea não substitui o procedimento cirúrgico porque a amostra de tecido hepático apresenta número reduzido de tratos portais e baixa sensibilidade diagnóstica (BOGLIOLO 1957, CHEEVER 1968, MAHARAJ *et al*, 1986).

Nos últimos 20 anos, a ultrassonografia abdominal (US) tornou-se a melhor ferramenta para a avaliação da fibrose hepática na esquistossomose mansônica (LAMBERTUCCI *et al*, 1996; RICHTER *et al*, 2001). Trata-se de método indireto para o diagnóstico e classificação da doença (ABDEL-LATIF *et al*, 1981; CERRI *et al*, 1984; FATAAR *et al*, 1984; GERSPACHER-LARA *et al*, 1998; HOMEIDA *et al*, 1988b; LAMBERTUCCI *et al*, 2001; PINTO-SILVA *et al*, 1994:). A ultrassonografia na esquistossomose hepatoesplênica demonstra alterações características da doença tais como: o espessamento da parede da veia porta e de seus ramos, fibrose hepática periportal e o espessamento da parede da vesícula biliar. No entanto a ultrassonografia tem desvantagens. É necessária a presença de

examinador treinado na aplicação do protocolo desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) especificamente para o diagnóstico dessa doença (NIAMEY WORKING GROUP 2000).

A ressonância magnética (RM) revelou-se técnica sensível e menos dependente do examinador do que a US. Ela foi usada na avaliação da esquistossomose hepatoesplênica (BEZERRA *et al*, 2004, 2007, 2008; LAMBERTUCCI *et al*, 2002, 2004; PATEL *et al*, 1993; SILVA *et al*, 2006; WILLEMSSEN *et al*, 1995), mas até o momento não existe padronização reconhecida pela OMS (SILVA *et al*, 2010).

A fibrose é hoje compreendida como desequilíbrio entre a deposição e a degradação dos componentes da matriz extracelular, dependente da presença de fatores agressores ao tecido em questão (GRIMAUD, 1987). A dosagem sorológica de marcadores do metabolismo do tecido conjuntivo tem sido utilizada como indicador de fibrose em diferentes doenças hepáticas (STONE, 2000; AFDHAL *et al*, 2004) e vem ganhando destaque atualmente também na esquistossomose (MARINHO *et al*, 2010; SILVA *et al*, 2011). Entretanto, sua capacidade de identificar o acometimento hepático e a evolução da fibrose na esquistossomose, carece de mais estudos.

A descoberta da célula hepática estrelada como a principal mediadora da deposição da matriz extracelular resultou na identificação de vários estímulos responsáveis pela sua ativação. Isso inclui as citocinas envolvidas na ativação e deposição da matriz (fator de crescimento e transformação - TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF), envolvidas na reversão desse processo ou até mesmo da degradação da fibrose (IL-10) (AFDHAL *et al*, 2004). Outras moléculas originadas da degradação da matriz extracelular (ácido hialurônico (AH), colágeno tipo IV, pró-colágeno III e laminina) tem sido utilizadas na avaliação da fibrose hepática (MARINHO *et al*, 2010; ROSSI *et al*, 2007; SANTOS *et al*, 2005). O PIIINP, o colágeno tipo IV, o ácido hialurônico e a laminina, assim como o YKL-40 são apontados na literatura como marcadores promissores da fibrose hepática de diversas etiologias (AFDHAL & CURRY 2007).

Neste estudo, compara-se a dosagem de marcadores não invasivos de fibrose hepática (ácido hialurônico, YKL40 e TGF- β 1) com a biópsia hepática em cunha analisada por patologista e pela histomorfometria. Utilizaram-se também métodos indiretos para a avaliação da fibrose hepática como a ultrassonografia e a ressonância magnética. O objetivo é avaliar a acurácia dos marcadores séricos para o diagnóstico e classificação da intensidade da fibrose hepática em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica acompanhados no CTR-DIP Orestes Diniz/Faculdade de Medicina UFMG, Belo Horizonte - MG.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da esquistossomose

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil indicam que uma população superior a 42 milhões de pessoas reside em zonas endêmicas e que mais de seis milhões estejam infectadas pelo *S. mansoni* (WHO, 2010).

A cercária é a forma infectante do *S. mansoni*. Dentro da água, ao encontrar o hospedeiro, ela penetra através da pele e migra na corrente sanguínea pelos pulmões. O *Schistosoma mansoni* é um trematódeo digenético que se instala preferencialmente no sistema venoso mesentérico do homem (FIG.1). Ao término do período de maturação de 4 a 6 semanas, o trematódeo inicia seu ciclo reprodutivo sexuado com a postura de ovos pela fêmea (GRYSSELS *et al*, 2006).

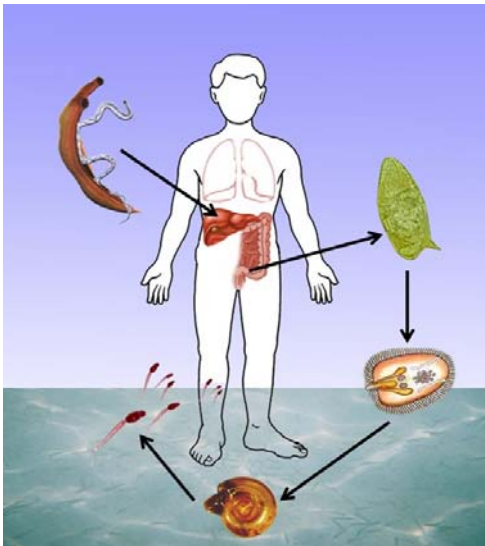


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* - Fonte: LAMBERTUCCI

Quando o ovo desse verme atinge os segmentos intra-hepáticos da veia porta, desencadeia reação inflamatória granulomatosa. Posteriormente o infiltrado inflamatório é substituído por fibrose e se estabelece a fibrose periportal, característica da forma hepatoesplênica da

esquistossomose (LENZI, 1998). Quando vistas na superfície do fígado em necrópsia, observam-se placas esbranquiçadas em contraste com o parênquima hepático bem preservado. Esse achado típico é chamado 'pipestem' – fibrose em haste de cachimbo desde SYMMERS (1904), um patologista britânico que trabalhava no Egito. Fumante de cachimbo, ele descreveu cada placa da superfície de corte do fígado como a secção do cabo de cachimbo de porcelana (FIG.2). O aspecto externo do órgão revela bocelamento: a cápsula de Glisson mostra-se espessa e opaca nas depressões e distendida e translúcida nas áreas protuberantes (FIG.3) (SYMMERS, 1904).

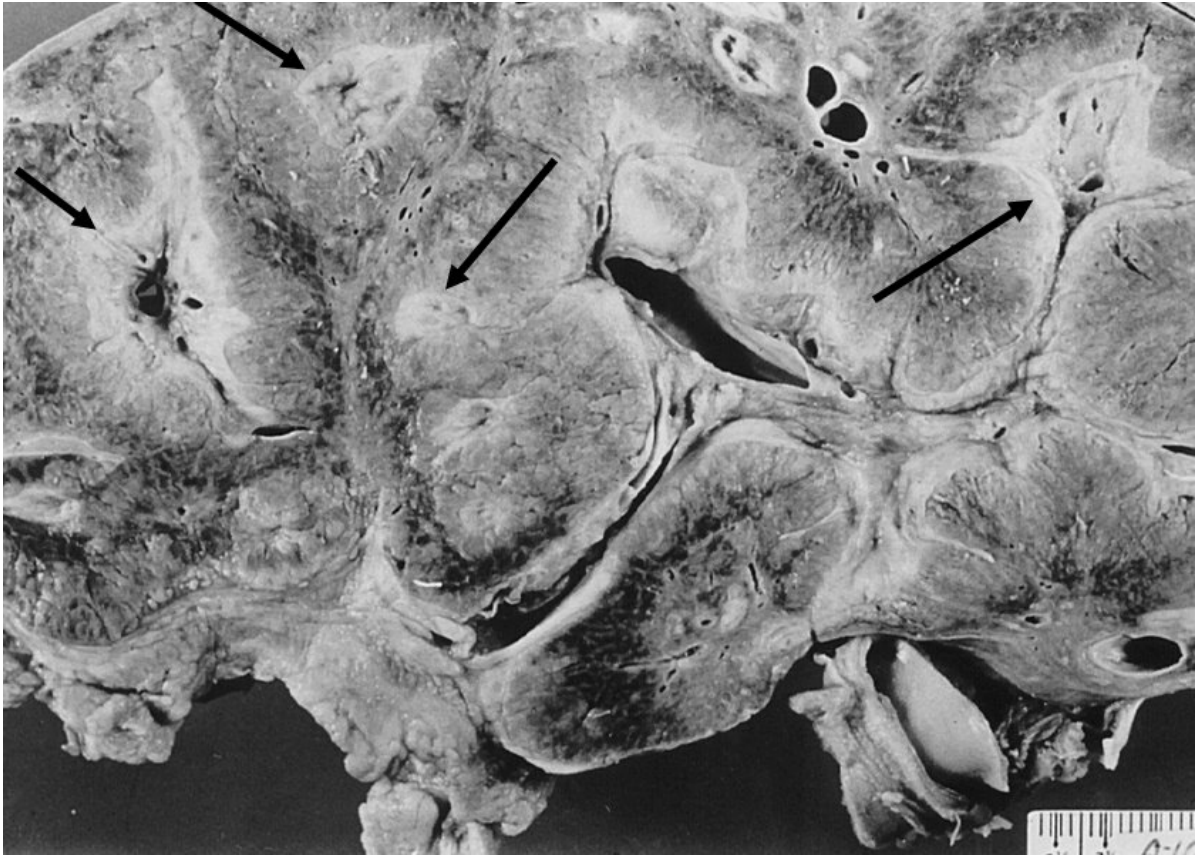


FIGURA 2- Grandes espaços porta, que aparecem como manchas brancas (setas) circundadas por parênquima hepático normal, lembrando hastes de cachimbo de porcelana (*clay-pipestem cirrhosis*).

Fonte: SYMMERS, 1904

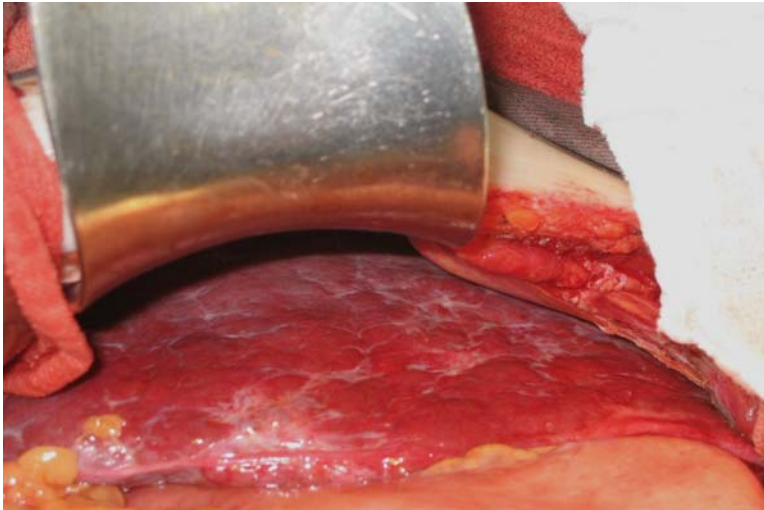


FIGURA 3 - Bocelamento da superfície do fígado na esquistossomose (VOIETA, 2007).

O diagnóstico da infecção esquistossomótica consiste na demonstração da presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes ou biópsias. Para tanto, utilizam-se o exame parasitológico de fezes (EPF) ou a biópsia retal. A sensibilidade do EPF pelo método de sedimentação espontânea é de 75 a 85% para três amostras de fezes, e a da biópsia retal, com retirada de vários fragmentos nas válvulas de *Houston*, encontra-se em torno de 80%. Eventualmente pode se lançar mão da biópsia hepática ou de outro órgão suspeito de acometimento. Entretanto, por se restringir ao espaço porta e não acometer difusamente o fígado, os granulomas periovulares podem não estar presentes no material biopsiado (CHEEVER, 1968; MAHARAJ *et al*, 1986). As biópsias em cunha são positivas para o granuloma em cerca de 60% dos casos, em contraste com 30% de positividade das biópsias por agulha. Dentre os exames indiretos para diagnóstico da doença, a sorologia mostra-se capaz de identificar exposição ao verme, sem significar doença ativa. A pesquisa de anticorpos contra o antígeno solúvel do ovo do *Schistosoma* (anti-SEA – *soluble egg antigen*) no soro, utilizando o método de ELISA, tem sensibilidade e especificidade de 98,8% e 67,8%, respectivamente (SANTOS *et al*, 2000).

Uma grande carga parasitária, reconhecida pela presença de numerosos ovos impactados no sistema porta e pela eliminação de centenas de ovos por grama de fezes, é uma condição necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da forma hepatoesplênica. Contudo, as investigações dos fatores determinantes dessa evolução clínica são ainda inconclusivas (ANDRADE *et al*, 1997; ANDRADE, 2004). A forma hepatoesplênica da esquistossomose

desenvolve-se ao longo de cinco a 15 anos, em indivíduos cronicamente expostos à infecção intensa, e com provável predisposição imunogenética. Caracteriza-se classicamente pela hepatomegalia às custas do lobo esquerdo, o que deve-se ao maior fluxo de sangue para este lobo proveniente da dilatação da veia esplênica, e à distribuição predominante de ovos nesta região. Hipertensão porta pré-sinusoidal pode se desenvolver e, como consequência, podem surgir esplenomegalia e circulação colateral, como varizes esofagianas e hemorroidárias. Além de a hipertensão porta levar à congestão crônica do baço, a esplenomegalia também se explica pela hiperplasia linfóide do órgão secundária a estímulos antigênicos provenientes dos vermes e seus produtos. Verifica-se a hipertensão porta pela presença de varizes esofagianas ou gástricas, e pelo hiperesplenismo, identificado pelas citopenias de graus variados. Até as fases mais tardias da doença observa-se a preservação da função do hepatócito (ANDRADE *et al*, 1997; ANDRADE, 2004; BOGLIOLO, 1957; LAMBERTUCCI *et al*, 2001; SYMMERS, 1904). Esse processo hipertensivo do sistema porta culmina com hemorragia digestiva, evento responsável pela mortalidade da doença e eventual disfunção hepática. Não se observa correlação estrita entre o grau de fibrose periportal e as manifestações da hipertensão porta, pois essa última resulta da intensidade das lesões obstrutivas vasculares e não da sua acompanhante fibrose porta (VOIETA *et al*, 2010). A terapêutica clínica específica para o sangramento visa ao aumento da capacidade do leito vascular esplâncnico por meio de medicamentos como os bloqueadores beta-adrenérgicos. A terapêutica justifica-se pela própria evolução natural da hipertensão porta, que aumenta o volume de sangue venoso abdominal. O inconveniente da terapêutica clínica é a sua eficácia apenas nos sangramentos menos intensos (OROZCO *et al*, 2000). A terapêutica endoscópica promove melhora temporária e requer múltiplas sessões de esclerose para reduzir as varizes esofágicas. Há ainda a possibilidade de a oclusão das varizes esofágicas elevar a pressão no leito vascular, aumentando o calibre das varizes do estômago e elevando o risco de sangramento em território gástrico, evento de difícil controle por outro meio que não seja cirúrgico (CELLO *et al*, 1987; SAKAI *et al*, 1995). A terapêutica cirúrgica tem por objetivo tratar e prevenir o sangramento. Tendo em vista a gravidade de cada hemorragia, que pode levar o indivíduo à morte pelo sangramento ou em decorrência de suas complicações, o paciente que sangrou deve ser tratado adequadamente. A maioria dos episódios de hemorragias em hipertensão porta esquistossomótica ocorre em adultos jovens sem outras doenças, que toleram bem o ato operatório, o que pode conceder resolução duradoura e geralmente definitiva para essa complicação (PETROIANU, 2003).

2.2 Morfologia hepática em esquistossomose

A primeira biópsia hepática percutânea no homem foi realizada em 1923 e nos últimos 50 anos tornou-se a principal ferramenta para o diagnóstico do estágio de doença hepática. Apesar do seu uso consagrado, a biópsia hepática tem indicação e técnica criteriosa e não é isenta de complicações (BRAVO *et al*, 2001). Além das conhecidas complicações inerentes ao procedimento, há o risco de não se obter amostra representativa da lesão hepática. O fígado de um adulto pesa em média 1.500g, e uma biópsia hepática padrão representa 1/50.000 de todo o órgão. Esse pequeno fragmento está associado a um erro amostral principalmente em doenças hepáticas fibrosantes com acometimento mais heterogêneo pela fibrose como a cirrose biliar primária ou a colangite esclerosante primária (GARRIDO & HUBSCHER, 1996). O erro amostral pode ser reduzido aumentando o número de fragmentos obtidos por paciente (ABDI *et al*, 1979), no entanto muitos médicos temem o aumento do risco de complicações. Finalmente, o tamanho do fragmento tem um papel muito importante. Bedossa e colaboradores (2003) utilizaram modelo criado por computador e sugeriram que uma biópsia de 25 mm implica em taxa de erro de 25% e que o fragmento ótimo deveria ter 40 mm. Poynard e colaboradores (2004) afirmam que mesmo em mãos experientes, somente cerca de 16% das biópsias atingem 20mm.

A interpretação anátomo patológica da biópsia hepática é subjetiva (SCHLICHTING *et al*, 1981) e vários escores de interpretação foram criados para limitar a variabilidade interobservador como o Ishak, Metavir e Knodell (BEDOSSA *et al*, 1988; PILETTE *et al*, 1998; WESTIN *et al*, 1999). A avaliação morfométrica computadorizada da fibrose hepática no tecido corado pode determinar a área de acometimento hepático em percentual, mas a correlação da área de fibrose com o estágio da doença é variável e apresenta melhores resultados em casos de fibrose avançada (O'BRIEN *et al*, 2000; ZAITOUN *et al*, 2001). A obtenção de biópsia hepática não fragmentada permanece essencial.

2.2.1 Granuloma esquistossomótico periovular

A reação em torno do ovo maduro do schistosoma – o granuloma periovular, é bem descrita, no entanto a morfologia varia com o tempo. Esse processo é controlado por diversos fatores e nem todos estão bem elucidados (ANDRADE, 2009). Andrade e Warren (1964) observaram que durante a infecção recente no camundongo, o granuloma periovular no fígado era grande, edematoso, rico em eosinófilos, apresentava centro necrótico e periferia desorganizada. Com o passar do tempo, enquanto os granulomas mais antigos involuíam, aqueles granulomas formados em torno de ovos recém chegados eram menores, fibróticos e com predomínio de macrófagos sobre eosinófilos na periferia. Essa modulação foi considerada mecanismo de proteção para o hospedeiro. Alguns pesquisadores focaram na identificação dos fatores envolvidos na modulação do granuloma esquistossomótico. Observou-se que o miracídio secretava material antigênico tipo carboidrato e o hospedeiro liberava enzimas (ANDRADE & BARKA, 1962). A maior fração antigênica conhecida é o antígeno solúvel do ovo (SEA) (PELLEY *et al*, 1976). Demonstrou-se que o SEA provoca uma resposta CD4 no hospedeiro que está inicialmente associada a Th1, mas posteriormente torna-se mais próxima do pólo Th2 (PEARCE, 2004). Além disso, o granuloma induzido pelo ovo e a fibrose hepática foram vistas como dependentes da regulação de citocinas como a interleucina 10 (IL-10) (ABATH *et al*, 2006). Alguns estudos revelaram que esse tipo de modulação ocorre exclusivamente no tecido hepático, já que no pulmão e no intestino os granulomas formados em torno dos ovos maduros não mudam de tamanho ou de morfologia com o tempo (SILVA *et al*, 2000). Uma característica particular que pode explicar esse aspecto da doença hepática pode estar associada à participação do sistema neuroendócrino hepático, na inflamação e na fibrose (ROSKAMS *et al*, 2004; OBEN & DIEHL, 2004). Estudos preliminares realizados em camundongos revelaram que o granuloma esquistossomótico no fígado, contém células que reagem a neuropeptídeos, moléculas neurais, a leptina e seus receptores (OBEN & DIEHL, 2004). Mais estudos, no entanto, são necessários para confirmar o papel do sistema neuroendócrino na modulação do granuloma esquistossomótico (WEINSTOCK *et al*, 1999).

Quanto ao significado funcional do granuloma periovular na esquistossomose, as primeiras opiniões foram as de que o granuloma servia para destruir o ovo e o miracídio contido nele.

Os eosinófilos estariam envolvidos na morte do miracídio (MAHMOUD *et al*, 1975; KEPHART *et al*, 1988). Outros estudos, no entanto, revelaram que os ovos permaneciam vivos dentro dos granulomas por mais de 7 dias após a morte de todos os vermes. Essa observação foi relatada em infecções recentes ou tardias, confirmando que isso ocorre independente da composição do granuloma, ou seja, independente da quantidade de eosinófilos. Por essa razão, o granuloma periovular é considerado funcionalmente importante para proteger o tecido do hospedeiro do dano enzimático sendo mais do que uma simples reação objetivando a destruição do miracídio (REIS & ANDRADE, 1987).

2.2.2 Fibrose periportal

A característica mais proeminente da doença hepática esquistossomótica é representada pela fibrose periportal que se estende dos menores para os maiores espaços portais. As grossas traves fibróticas podem ser vistas na superfície do fígado em necrópsias e através de técnicas de imagem como ultrassonografia e ressonância magnética (FRANKE *et al*, 1991; HOMEIDA *et al*, 1988a). Essa extensa área de fibrose portal está associada a uma elevada carga parasitária já que é a presença de numerosos ovos que causa a obstrução dos ramos periféricos dos pequenos vasos portais (ANDRADE, 2009).

A fibrose esquistossomótica está associada à regulação imunológica e está fortemente relacionada aos mesmos padrões de citocinas induzidos pelo ovo do *Schistosoma*. As citocinas Th2 e particularmente a IL-13 e os receptores da IL-13 (IL-13 α 2) têm papel fundamental na fibrogênese hepática associada a esquistossomose (WYNN, 2004).

2.2.3 Alterações vasculares

Erra quem assume que o fator mais importante para a patogênese da doença é a fibrose e que ela é que vai obstruir o fluxo sanguíneo, aumentar a pressão sanguínea e promover o

desenvolvimento de shunts porto-sistêmicos. Ela ocorre devido ao aumento da matriz extracelular do tecido conectivo intersticial que normalmente apóia os vasos linfáticos e sanguíneos, nervos e ductos biliares no fígado. Porém, a fibrose hepática *per se* não ocasiona problemas em um órgão como o fígado que possui grande reserva funcional, a menos que as estruturas que se apoiam na fibrose sejam danificadas. Os ovos de *Schistosoma* são importantes na patogênese da esquistossomose porque causam obstrução e dano vascular direto (ANDRADE, 2009). Estudo recente realizado em humanos com esquistossomose avançada, utilizando histologia, morfometria, ultrassonografia e imagem por ressonância magnética, não encontrou correlação entre a intensidade da fibrose e a gravidade das manifestações clínicas (VOIETA *et al*, 2010).

A fibrose esquistossomótica é acompanhada de inúmeras alterações vasculares no hospedeiro. O melhor modo de apreciar essas alterações é examinar modelos plásticos nos quais os três sistemas vasculares do fígado são preenchidos ao mesmo tempo com cores diferentes (ANDRADE & CHEEVER, 1971). O sistema venoso porta aparece reduzido e aparenta ser a rede menos proeminente dos três, com considerável redução dos ramos periféricos mais finos (FIG. 4). Em torno dos grandes ramos tortuosos nota-se rede vascular fina, que algumas vezes se parecem com fios de cabelos em torno dos vasos principais. Veias portais grandes ou médias frequentemente apresentam abrupta diminuição do diâmetro, às vezes terminando como ponta de lápis (FIG 5). Observam-se também comunicações do tipo curto circuito entre os ramos vizinhos. Contudo, os elementos da parede vascular não são alterados quando comparados com os vasos obtidos de fígados normais. Já o sistema arterial hepático apresenta importante hipertrofia e hiperplasia, especialmente no sítio do plexo vascular peri-biliar (ANDRADE, 2009).

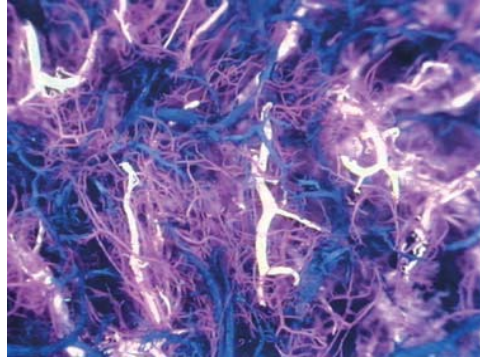


FIGURA 4 - Alterações do sistema vascular hepático observadas em fígado humano de paciente com esquistossomose avançada após injeção de acetato de vinil e corrosão tecidual. A veia porta (branco), artéria hepática (vermelho) e veia hepática (azul). (ANDRADE, 2009).

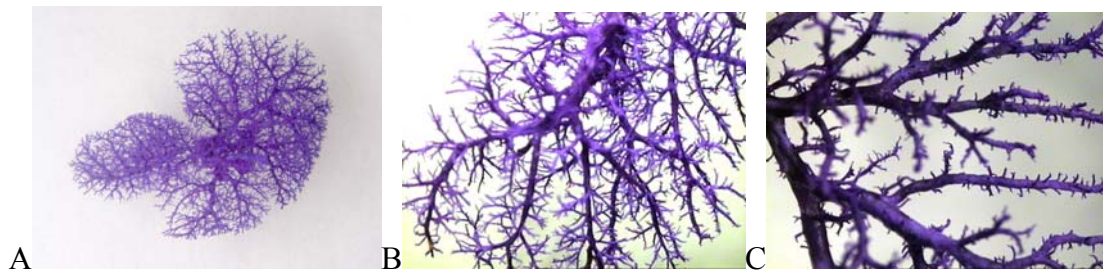


FIGURA 5 - Modelo em vinil plástico demonstra a veia porta de modelo experimental normal (A) e infectado com cercárias (B e C) evidenciando a amputação das ramificações vasculares (Fotos cedidas pelo Professor Zilton Andrade).

A destruição dos ramos venosos portais periférico associada à oclusão ou amputação de alguns ramos de médio calibre contribui para a ocorrência de hipertensão porta. As alterações vistas nas artérias hepáticas são consideradas compensatórias como consequência da redução do fluxo venoso portal. Essa alteração vascular é crucial na esquistossomose avançada, responsável pelo aumento da pressão sinusoidal e capilarização dos sinusóides. Essas alterações constituem elementos funcionais importantes na fase chamada descompensada da esquistossomose. A adicional desvantagem da hipertrofia arterial compensatória é que ela torna o parênquima hepático dependente do fluxo arterial já que o fluxo venoso encontra-se reduzido. A situação torna-se crítica quando a pressão arterial apresenta queda abrupta como o que ocorre no sangramento digestivo secundário à ruptura de varizes esofágicas (ANDRADE, 2009). Quando o paciente sobrevive a esse episódio, a área focal de parênquima isquêmico sofre necrose e origina uma área cicatricial (ANDRADE, 2004). Essas áreas com focos nodulares de regeneração envolvidas em traves fibróticas e septos, usualmente ocorrem

abaixo da cápsula hepática e quando vistas em fases mais tardias, podem ser erroneamente diagnosticadas como cirrose (ANDRADE, 2009).

2.2.4 Angiogênese e esquistossomose

Muitos estudos chamaram a atenção para o fato de que a angiogênese, proliferação de numerosos capilares sanguíneos a partir de vasos existentes, precede na maioria dos casos, a fibrose hepática (MEDINA *et al*, 2005; ROSMORDUC *et al*, 1999; SOUZA *et al*, 2006). Reconhecendo a importância desses relatos um editorial no jornal de hepatologia sugere que drogas anti-angiogênicas deverão no futuro ser utilizadas para o tratamento de doenças hepáticas crônicas (LAI & ADAMS, 2005).

O processo de formação da fibrose pode ocorrer em qualquer órgão do organismo vivo a partir de tecido granular que representa a característica básica inicial das doenças. No fígado esse processo é dependente de um tipo celular especial, a célula estrelada, que é um pericito, porém com a característica peculiar de armazenar lipídios e vitamina A (FRIEDMAN, 2008). Inicialmente, pensava-se que a célula estrelada era o único fator celular responsável pela produção da fibrose. No entanto, estudos mais recentes, avaliaram a relação da fibrose com a angiogênese e confirmaram que a fibrose pode ter origem de diferentes estruturas hepáticas, o que envolve os vasos e suas células associadas, os sinusóides hepáticos e as células estreladas parasinusoidais (CASSIMAN & ROSKAMS, 2002).

Apesar dos pericitos terem sido descritos há mais de um século (BERGERS & SONG, 2005), apenas recentemente sua importância foi reconhecida e estudada (LEE *et al*, 2007). Primeiramente, por conter actina e estar localizado na membrana, pensava-se que o pericito fosse responsável pela contratilidade da parede do capilar e que sua única função era regular o fluxo sanguíneo. No entanto, ele pode se desprepar da parede do capilar e assumir a função de miofibroblasto no tecido conjuntivo. Assim a relação entre a angiogênese e a fibrose torna-se

clara, já que os miofibroblastos possuem importância na fibrogênese (MEDRADO *et al*, 2008).

A angiogênese merece destaque na doença esquistossomótica. Essa afirmação pode parecer paradoxal já que o *S.mansoni* é um parasito intravascular e que causa lesões através da destruição de vasos sanguíneos, especialmente hepáticos (ANDRADE, 2004). Lenzi *et al*. (1998) demonstraram que as células endoteliais, identificadas por imunohistoquímica através do fator VIII, estão presentes em grande número dentro dos granulomas periovulares esquistossomóticos. Eles sugerem que as células endoteliais têm um papel fundamental não somente na formação do granuloma, mas também na patogênese da esquistossomose. Adicionalmente, estudos *in vitro* revelaram que o antígeno solúvel do ovo (SEA) induz a proliferação de células endoteliais (FREEDMAN & OTTESEN, 1988) e que também aumenta a liberação de fator de crescimento endotelial (VEGF) e angiogênese (LOEFFLER *et al*, 2002).

Baptista A e Andrade Z (2005) em um estudo que combinou técnicas morfológicas revelaram que a angiogênese tem um papel dinâmico e fundamental *in vivo* durante a formação do granuloma periovular. A proliferação vascular pode ser notada precocemente no granuloma periovular, mas logo os vasos são deslocados para a periferia formando um colar vascular em torno do granuloma enquanto o centro fica aparentemente avascular. Quando ocorre a fusão de vários granulomas, como ocorre em homens ou camundongos nos quais ocorreu a infecção maciça, os pequenos vasos proliferados aparecem de forma proeminente entre os granulomas e o tecido fibroso e assume uma aparência angiomasiosa. Apesar da proliferação vascular, muitos vasos são destruídos. Na infecção grave, os vasos portais periféricos são progressivamente amputados o que resulta no aumento da pressão no sistema porta, criando condições para que novos ovos cheguem e continuem impactando dentro dos vasos cada vez maiores. Assim, ramos portais de diferentes calibres tornam-se parcial ou totalmente ocluídos.

2.2.5 Regressão da fibrose esquistossomótica

Recentemente a regressão da fibrose ganhou considerável atenção. A fibrose hepática avançada, principalmente quando associada à cirrose, foi considerada irreversível por muitos anos. Hoje, esse conceito tem sofrido alterações diante da utilização de medicamentos com eficácia na redução da fibrose hepática e melhora clínica dos pacientes portadores de doença hepática crônica (ANDRADE, 2008). Esses dados clínicos estimularam pesquisas sobre as causas e mecanismo da evolução e da involução da fibrose como pode ser visto em várias revisões atuais (ARTHUR, 2002; BATALLER & BRENNER, 2005; BEDOSSA & PARADIS, 2003; BENYON & IREDALE, 2000; BROWN, 2000; DESMET & ROSKAMS, 2004; FRIEDMAN, 2003).

A formação e a degradação da matriz extracelular são processos equilibrados e dependentes dos mesmos tipos celulares. O acúmulo do excesso de matriz (fibrose) ocorre quando a síntese excede a taxa normal de degradação. A inflamação crônica como a que ocorre comumente nas infecções parasitárias, é importante na promoção da formação da matriz. Quando a causa é removida e a inflamação diminui predomina a degradação do excesso de matriz que resulta no restabelecimento da normalidade ou quase normalidade do parênquima. No caso da infecção, quanto mais nova a fibrose, mais rapidamente ocorrerá sua degradação. Esse processo também ocorre em fibroses mais antigas, porém de forma mais lenta e com morfologia peculiar. Primeiramente, a explicação para a pronta degradação da matriz após tratamento adequado na esquistossomose recente, em oposição com a observada na esquistossomose de longa evolução, é baseada na predominância do colágeno do tipo III nos granulomas mais novos, um colágeno de mais fácil degradação. Estudaram-se fígados de camundongos com oito semanas de vida e infectados com 50 cercárias; análises bioquímicas revelaram que o colágeno do tipo III aumentou 22 vezes enquanto o colágeno do tipo I aumentou 11 vezes (BIEMPICA *et al.*, 1983). Observações sequenciais com microscopia de imunofluorescência revelaram que ambos os tipos de colágenos desapareceram gradualmente e simultaneamente, mas muito mais rápido nos camundongos infectados há menos tempo (ANDRADE & GRIAMAUD, 1986; 1988). Com o tempo, o colágeno adquire ligações inter e

intramoleculares e essa deve ser a razão pela qual se torna mais resistente à degradação (ANDRADE, 2009).

É importante salientar que os pacientes com diagnóstico de esquistossomose hepatoesplênica tratados podem apresentar regressão da fibrose durante meses ou anos. Presume-se que não só a fibrose hepática regrediu, mas um grau considerável de remodelamento dos vasos intrahepáticos também pode ocorrer (ANDRADE, 2009).

2.3 Fibrogênese hepática

A doença hepática esquistossomótica tem início com a necrose celular endotelial resultante da embolização de ovos do parasito para os ramos portais intraparenquimatosos. Inicia-se o processo inflamatório, através da apresentação dos antígenos do ovo pelos macrófagos para os linfócitos, recrutamento e mobilização de monócitos, eosinófilos e células do tecido conjuntivo. Esse conjunto, regido pelas citocinas características da resposta orientada à tolerância parasitária, dá início à formação do granuloma. Concomitantemente, inicia-se a produção e deposição dos componentes intersticiais e da lâmina basal da matriz extracelular (MEC). Esses fenômenos resultam na contenção dos processos inflamatórios e desencadeamento imediato dos fenômenos de reparação tecidual através da fibrose (GRIMAUD, 1987).

A célula estrelada, anteriormente denominada célula de Ito, célula armazenadora de gordura ou lipócito, representa cerca de um terço da população de células não parenquimatosas e aproximadamente 15% do total de células residentes no fígado, incluindo os hepatócitos. Caracteriza-se por ser uma população celular heterogênea, com fenótipos variados em termos de citofilamentos, conteúdo de retinóides e capacidade de ativação. Localiza-se preferencialmente nas proximidades dos sinusóides com citoesqueleto que assume orientação circunferencial, justaposto ao endotélio. Na forma inativa, é a célula responsável pelo armazenamento e metabolismo dos retinóides. A partir da ativação, a célula estrelada assume

diferentes funções, podendo apresentar antígenos, produzir citocinas fibrogênicas e auxiliar na ativação da reação inflamatória e da regeneração celular através da produção de fatores de crescimento ou da sua própria diferenciação. Ela atua também no controle do tônus sinusoidal, da migração celular, da eritropoiese e da angiogênese. Depois de ativada, participa principalmente da produção dos componentes da MEC e das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo (GRESSNER *et al*, 2007).

As alterações fenotípicas representam características do processo de ativação da célula estrelada. Ocorre inicialmente proliferação celular e transição fenotípica para miofibroblastos. A característica desta fase é a expressão de α -actina e de filamentos finos proeminentes, conferindo à célula estrelada a nova conformação de célula muscular lisa, com capacidade contrátil, responsiva aos fatores reguladores do tônus muscular: endotelina-1 (ET-1), vasopressina e angiotensina-II. Inicia-se então a produção e secreção de componentes da matriz extracelular (MEC) e enzimas de degradação da matriz pré-existente. Através de sinalização química induz a atração de mais células estreladas e leucócitos. O meio extracelular é modificado pela degradação e substituição dos componentes da matriz. Os novos componentes são, por sua vez, capazes de promover ativação celular adicional (GRESSNER & BACHEM, 1990; GRESSNER, 1998; KISSELEVA & BRENNER, 2007).

A MEC é composta principalmente de colágenos do tipo I (C-I) e IV (C-IV), substâncias glicoconjugadas como os proteoglicanos, fibronectina, ácido hialurônico e laminina. As células estreladas hepáticas (CEH) constituem as principais formadoras da MEC e são ativadas por diversos estímulos inflamatórios (TSUKADA *et al*, 2006). O processo de ativação celular é comum aos diversos mecanismos iniciadores, sejam eles inflamação, necrose ou peroxidação. Os mediadores da ativação originam-se primariamente nas células de Kupffer, hepatócitos, linfócitos e plaquetas. Ocorre aumento da expressão de receptores celulares para citocinas proliferativas e fibrogênicas (FRIEDMAN, 2000). O principal ativador da proliferação celular, o fator de crescimento derivado das plaquetas, PDGF, é produzido pelas plaquetas, células de Kupffer, endotélio e pelas próprias células estreladas ativadas. Outros indutores da proliferação da célula estrelada são os fatores de crescimento de fibroblastos e epidérmico (FGF, EGF), a IL-1, o TGF- α . A TGF- β 1 é a citocina mais potente

para a indução de fibrogênese, é produzida por diversos tipos celulares, inclusive por células estreladas já ativadas, de forma autócrina (BLAZEJEWSKY *et al*, 1995; FRIEDMAN, 1993; 1999; NAKATSUKASA *et al*, 1990). A inibição da síntese de TGF- β 1 em modelo experimental impede a produção da fibrose (QI *et al.*, 1999).

A célula ativada inicia a degradação da matriz pela liberação de enzimas metaloproteinases (MMP), e ao mesmo tempo modula este processo com a produção dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP). Dá-se a lise protéica dos componentes frouxos da matriz, entre eles o colágeno tipo IV (C-IV), e sua substituição por moléculas formadoras de fibrilas, os colágenos tipo I e III (FRIEDMAN, 1993; KISSELEVA & BRENNER, 2007; NAKATSUKASA *et al.*, 1990). Entre os componentes não-colagenosos, verifica-se aumento do conteúdo de proteoglicanos, ácido hialurônico, laminina e fibronectina (GRESSNER & BACHEM, 1990). Em 1973, foi demonstrado em um estudo de necrópsias, que o conteúdo de colágeno e de glicosaminoglicanos em fígado de pacientes portadores de hepatite alcoólica ou cirrose é maior que em pacientes com fígado normal ou com esteatose (GALAMBOS & SHAPIRA, 1973).

No processo de ativação e diferenciação da célula estrelada são identificadas três fases: pré-inflamatória, inflamatória e pós-inflamatória. Na fase pré-inflamatória, os hepatócitos necróticos ou apoptóticos ativam diretamente as células estreladas. Este processo é mediado por fatores mitogênicos, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1 e o TGF- β . Em paralelo, observa-se a liberação de marcadores de lesão hepatocelular, LDH e AST. Na fase inflamatória, as células estreladas sofrem estímulo adicional pelos macrófagos residentes, leucócitos e plaquetas, células endoteliais sinusoidais e hepatócitos, para sua diferenciação em miofibroblastos. Os principais mediadores são o TGF- β e o TGF- α . A fase pós-inflamatória consiste na ativação de células estreladas ainda quiescentes e na perpetuação do estímulo de forma autócrina, pelas citocinas produzidas pelos próprios miofibroblastos (GRESSNER *et al*, 2007).

O conhecimento da fisiopatologia da fibrogênese hepática, aliado ao desenvolvimento de técnicas laboratoriais para a dosagem de substâncias envolvidas na deposição, remodelamento e degradação da matriz, possibilitou a identificação de marcadores úteis na investigação do grau de fibrose hepática. Contudo, é possível que as dosagens realizadas em sangue periférico não reflitam a real atividade do parênquima hepático. Torre *et al.* (2008) abordam essa questão, comparando amostras pareadas e simultâneas de sangue colhido na veia hepática direita na ocasião da realização de estudo hemodinâmico do sistema porta e de sangue periférico em 15 pacientes. O estudo mostrou boa correlação entre as dosagens hepática e periférica de diversos marcadores, entre eles o AH. Alguns dos marcadores de fibrose resultam ou participam diretamente do processo de remodelamento, como o AH, o C-IV, MMPs, TIMPs, pró-colágeno tipo III, laminina, TGF- β e YKL-40 (AFDHAL & NUNES, 2004; GRIGORESCU, 2006).

2.4 Avaliação da fibrose hepática esquistossomótica utilizando métodos de imagem

Em 2000, a OMS produziu um conjunto de diretrizes para a avaliação ultrassonográfica da esquistossomose, trazendo uniformidade para sua aplicação tanto no diagnóstico clínico quanto na investigação científica (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). Nessa publicação encontram-se definidos os cortes para avaliação ultrassonográfica do fígado, os padrões esquemáticos de imagem hepática ultrassonográfica (ANEXO A), a metodologia para a medida do diâmetro dos ramos portais de segunda ordem e a organometria dos lobos direito e esquerdo do fígado, baço, diâmetro interno da veia porta e espessura da parede dos ramos secundários da veia porta. Aspectos qualitativos da textura hepática nas regiões periportais e as variáveis quantitativas, como calibre de vasos e espessura de suas paredes (ramos subsegmentares da veia porta), foram utilizados para a classificação da morbidade ultrassonográfica da doença. Esses padrões de avaliação criados pela OMS permitiram o estudo mais dinâmico, porém a concordância entre examinadores permaneceu baixa (KING *et al.*, 2003).

Na opinião de Pinto-Silva e colaboradores (2010) a experiência do examinador é um diferencial na realização do exame. Os padrões B, C, D e Dc da OMS que representam os pacientes com fibrose hepática leve são de difícil diferenciação do indivíduo com fígado normal e também dos indivíduos portadores de outras doenças (RUIZ-GUEVARA, 2005). Em alguns casos, há a tendência de subestimar a presença da fibrose hepática esquistossomótica (PINTO-SILVA *et al*, 2010).

Utilizando-se da ultrassonografia e do Doppler pode-se suspeitar de hipertensão porta. Observa-se a dilatação de um ou mais ramos das veias porta, mesentérica e esplênica ou a presença de veias colaterais. Os diâmetros considerados normais para os adultos são: veia porta ≤ 12 mm; veia mesentérica superior e veias esplênicas ≤ 9 mm. As veias colaterais comumente descritas são gástrica esquerda e direita, gástrica curta, paraumbilical e esplenorrenal. Outros vasos são descritos com menor frequência como esplenointercostal e shunts diretos entre os ramos portais e as veias hepáticas (PINTO-SILVA *et al*, 1994). O fluxo de sangue da veia paraumbilical segue em direção à cicatriz umbilical, onde se junta aos ramos superficiais das veias epigástricas o que pode resultar em “caput medusae” – cabeça de medusa (PINTO-SILVA *et al*, 2010). A utilização do Doppler colorido aumenta a sensibilidade já que ele detecta a presença e a direção do fluxo sanguíneo e a presença da circulação hepatofuga, além disso, torna-se possível medir a velocidade do fluxo e estimar o fluxo-minuto que indiretamente detecta qualquer alteração fisiopatológica na circulação porta (PINTO-SILVA *et al*, 2010).

Um avanço promissor na tecnologia da ultrassonografia é a análise de ondas elásticas de baixa frequência. A elastografia é uma técnica emergente mais sensível para o estadiamento da fibrose hepática. Essa técnica realiza de forma rápida e não invasiva, as medidas da consistência do fígado. A consistência hepática está relacionada à intensidade da fibrose. Utilizando uma sonda (Fibroscan, Echosens, Paris) que inclui o transdutor ultrassônico, a vibração de baixa frequência (50MHz) e amplitude é transmitida ao fígado. A vibração das ondas de ultrassom se propagam pelo órgão. A velocidade dessas ondas ao atravessar o fígado correlaciona-se diretamente com a consistência do órgão. Quanto mais consistente o fígado, mais rápida é a propagação das ondas. O resultado é expresso em kilopascal (KPa). O

Fibroscan mede a consistência do volume aproximadamente 100 vezes maior que o da biópsia hepática padrão. Portanto o Fibroscan é mais representativo de todo o parênquima hepático. A elastografia preenche alguns dos critérios desejáveis para a avaliação não invasiva da fibrose hepática. O método é rápido, barato, reproduzível e indolor. As limitações do método são a impossibilidade de avaliação na presença de ascite, em pacientes obesos ou com espaço intercostal reduzido. Até o momento, estudos preliminares predizem um futuro promissor na avaliação confiável da fibrose hepática por esse método (KELLEHER & AFHAL, 2005).

A ressonância magnética (RM) tem se mostrado um método de imagem promissor na avaliação dos portadores de esquistossomose. Em 1995, sua utilização para o diagnóstico de um paciente portador de fibrose hepática esquistossomótica foi descrita pela primeira vez. A fibrose periportal produz faixas de sinal hipointenso ou isoíntenso em imagens ponderadas em T1, e de alta intensidade nas imagens em T2 (MANZELLA *et al*, 2007; WILLEMSSEN *et al*, 1995). Desde então esse método de imagem foi utilizado em vários estudos de casos em esquistossomose para descrever as alterações características (BEZERRA *et al*, 2004, 2007; LAMBERTUCCI *et al*, 2002, 2004; PATEL *et al*, 1993; SILVA *et al*, 2006; WILLEMSSEN *et al*, 1995). É um exame com baixa variação intra e inter observadores para sua leitura, ao contrário da ultrassonografia (LAMBERTUCCI *et al*, 2002; 2004).

Não há na literatura padronização para a avaliação da fibrose hepática na esquistossomose utilizando esse método de imagem e recentemente Silva e colaboradores (2010) utilizaram os padrões da OMS descritos para a avaliação ultrassonográfica e os adaptou para a ressonância magnética. A autora concluiu que precisa ser criado um padrão específico de avaliação para a utilização desse método de imagem.

Poucos estudos utilizaram a tomografia computadorizada (TC) na avaliação da forma hepatoesplênica da esquistossomose. Um grupo de pesquisadores descreveu imagens obtidas por tomografia computadorizada abdominal de cinco pacientes com evidência de fibrose periportal pelo US. Três desses pacientes tiveram confirmação histológica do diagnóstico de esquistossomose. As áreas de hipodensidade periportal apresentaram realce pelo contraste

após a injeção de meio iodado (FATAAR *et al*, 1985; MANZELLA *et al*, 2007). No entanto, as imagens de hipodensidade periportal passíveis de acentuação por meio de contraste são inespecíficas, tendo sido descritas também em 28 portadores de sarcoma de Kaposi hepático na SIDA e após o tratamento quimioterápico para diferentes doenças neoplásicas (HAMMERMAN *et al*, 1991).

A investigação científica de métodos alternativos de imagem objetivando maior precisão na classificação dos pacientes com as formas crônicas da esquistossomose é altamente pertinente. Além das restrições impostas pelo alto custo de métodos como a TC e a RM, esses são métodos que exigem aparelhagem específica de grande porte, na maioria das vezes indisponíveis em áreas endêmicas. Mesmo a ultrassonografia encontra limitações ainda nos dias atuais, não só pela indisponibilidade de aparelhos nas áreas mais carentes, mas também por exigir a presença de examinadores treinados na técnica e, mais ainda, na aplicação das diretrizes estabelecidas pela OMS (MARINHO *et al*, 2010).

2.5 Marcadores não invasivos de fibrose hepática em esquistossomose

A biópsia é o padrão ouro para a avaliação da fibrose hepática, no entanto é um procedimento invasivo e potencialmente arriscado (IMBERT-BISMUT *et al*, 2001, MYERS *et al*, 2002, POYNARD *et al*, 2005, WAI *et al*, 2003). Apresenta ainda custo elevado, requer médicos, equipe treinada e patologista experiente. A biópsia percutânea, por representar apenas pequena porção de todo o órgão pode gerar amostras não representativas e com erros na avaliação da fibrose hepática (LICHTINGHAGEN & BAHR, 2004). Não há até o momento marcador bioquímico capaz de substituir a biópsia hepática na avaliação da intensidade da fibrose em esquistossomose (BURCHARDT *et al*, 1998, KOPKE-AGUIAR *et al*, 2002, MARINHO *et al*, 2010, RICHARD-BLUM *et al*, 1999).

Os marcadores representam as medidas de uma ou mais moléculas realizadas em amostra sérica e avaliada como biomarcador de fibrose hepática. São vários os biomarcadores

propostos para a avaliação da fibrose hepática, isolados ou em associação. O verdadeiro marcador de fibrose seria capaz de não somente refletir o estágio da fibrose, mas também correlacioná-lo com a clínica. Esse biomarcador, capaz de substituir a biópsia hepática teria que conter características ideais tais como: ser fígado específico, independente de alterações metabólicas, fácil realização, minimamente influenciado pela excreção urinária ou biliar, reflexo da fibrose independente da causa, sensível o suficiente para diferenciar os estágios de fibrose, correlacionado às alterações dinâmicas da fibrogênese ou redução da fibrose (FRIEDMAN, 2003).

O desenvolvimento de testes não invasivos como preditores da intensidade da fibrose e de sua progressão representa uma prioridade entre os pesquisadores e médicos. Entre os testes não invasivos estão os marcadores séricos, utilizados individualmente ou combinados além de técnicas de imagem como a ultrassonografia, ressonância magnética e elastografia (CASTERA *et al*, 2008, GRESSNER *et al*, 2007, SANDRIN *et al*, 2003, ZIOL *et al*, 2005).

Estudos recentes sugerem que alguns desses marcadores podem ser utilizados em combinação formando escores de fibrose como o Fibrotest e Actitest (POYNARD *et al*, 2002, 2004, 2005), índice de Forns (FORNS *et al*, 2002) e AST/ plaquetas (WAI *et al*, 2003), informando sobre o estágio da doença, bem como a presença ou ausência de fibrose ou cirrose. Esses escores, no entanto não são bons preditores de níveis intermediários de fibrose e têm elevado risco de resultados falso-positivos e falso-negativos (POYNARD *et al*, 2005). A maioria desses escores foram desenvolvidos e testados para pacientes portadores de hepatite viral C, portanto a extrapolação dos resultados para outras doenças fibrosantes deve ser considerada com cautela (GRESSNER *et al*, 2007).

Os marcadores de fibrose são categorizados em diretos ou indiretos. Os marcadores indiretos utilizam a contagem de plaquetas, o estudo da coagulação e das transaminases, refletem alterações da função hepática, mas não refletem diretamente o metabolismo da matriz extracelular. Os marcadores diretos da fibrose refletem o remodelamento da matriz extracelular. A combinação desses marcadores, diretos e indiretos, surge como alternativa promissora à biópsia hepática (FORNS *et al*, 2002; THABUT *et al*, 2003; WAI *et al*, 2003).

2.5.1 Marcadores diretos da fibrogênese hepática

A matriz extracelular é formada por um grupo de macromoléculas que representa a transição entre o fígado normal e a fibrose hepática. A fibrose hepática resulta em alterações quantitativas e qualitativas dos marcadores da matriz extracelular. A avaliação dinâmica da atividade dessa matriz seria ideal já que alguns marcadores refletem a fibrogênese e outros a regressão da fibrose. Dentre os potenciais marcadores de fibrose estão produtos da síntese do colágeno ou de sua degradação, enzimas envolvidas na síntese ou degradação da matriz, glicoproteínas da matriz extracelular, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Particularmente, nenhum dos marcadores diretos avaliados é fígado específico e todos são afetados por alterações na purificação, metabolismo e excreção. Os marcadores diretos de fibrose mais relatados na literatura são os seguintes (KELLEHER *et al*, 2005):

- Marcadores de remoção da matriz: procolágeno peptídeo IV C, procolágeno peptídeo IV N (colágeno 7-S), colágeno IV, metaloproteinase MMP;
- Marcadores de deposição da matriz: procolágeno I peptídeo carboxi terminal (PICP), procolágeno III peptídeo amino terminal (PIIINP), inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP), fator de crescimento e transformação beta (TGF- β);
- Incertos: ácido hialurônico, YKL40;
- Análise combinada de marcadores: Fibrose hepática Européia (ELF), ácido hialurônico sérico AST e albumina (SHASTA), fibrospect.

2.5.2 Marcadores de interesse:

2.5.2.1 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH), polissacarídeo de alto peso molecular, apresenta diversas funções no organismo, tais como: estabilização da matriz extracelular, lubrificação das articulações, homeostase hídrica, regulação da distribuição proteico plasmática, barreira para a disseminação de microorganismos e regulação de atividades celulares (FRASER *et al*, 1997,

GERDIN & HALLGREN, 1997). Laurent e colaboradores (1981) foram os primeiros a mostrar a presença de AH e descrever o seu metabolismo no sangue periférico. Trata-se de substância de distribuição ubíqua no organismo, com meia-vida curta de apenas dois a nove minutos. As células estreladas hepáticas (CEH) ou células de Ito são as principais produtoras de AH no organismo e os capilares sinusoidais são os maiores responsáveis pelo seu clareamento. Cerca de 10 a 100mg de AH são lançados diariamente na corrente sanguínea. Indivíduos saudáveis apresentam níveis séricos de AH que variam de 10 a 100 mcg/L (MARTINS *et al*, 2003). A concentração do AH no soro varia com a idade, ocorrendo aumento com o passar dos anos. Doenças fibrosantes, colagenoses, septicemias, neoplasias e doença renal crônica também alteram a concentração (FRASER *et al*, 1997; LAURENT & FRASER, 1992).

O AH atua como citocina pró-inflamatória através da interação com o receptor CD44 (glicoproteína transmembrana tipo 1), presente na superfície de linfócitos e macrófagos. Aumento da expressão de AH ocorre na superfície das células endoteliais mediante estímulos inflamatórios. A ligação do AH com o CD44 de linfócitos e macrófagos proporciona a transmigração vascular dessas células (MOHAMADZADEH *et al*, 1998).

A medida dos níveis séricos de AH pode ser obtida por diversas técnicas: radiometria (I^{125}), imunoensaio, ensaio imunoenzimático – ELISA competitivo e não competitivo. O “ELISA-sanduiche”, ensaio baseado em imunofluorescência é a técnica mais utilizada atualmente e encontra-se disponível na forma de *kit* comercial (MARTINS *et al*, 2003).

Nas doenças hepáticas fibrosantes de diversas etiologias, observa-se elevação dos níveis de AH, o que pode relacionar-se tanto com o aumento da produção quanto à redução do metabolismo pelo endotélio sinusoidal (ENGSTROM-LAURENT & LOOF, 1985; GUÉCHOT *et al*, 1995; McHUTCHISON *et al*, 2000; NINOMIYA *et al*, 1998; OLIVEIRA *et al*, 2006; PLEVRIS *et al*, 2000).

2.5.2.2 YKL-40

O YKL40 é uma glicoproteína de 39kDa também conhecida como proteína 1- quitinase humana (HC-gp39) (HORBINSKI *et al*, 2010). É secretado por molécula inflamatória sem atividade quitinolítica e atua como fator de crescimento de fibroblastos, condrócitos e células sinoviais, sendo descrito também como marcador de fibrose hepática. É um potente fator de migração para células endoteliais e foi demonstrada coloração positiva por imunohistoquímica para esse marcador em áreas de fibrose hepática em evolução (JOHANSEN *et al*, 2000). O YKL-40 não tem receptor conhecido, mas é capaz de se ligar ao oligômero N-acetilglicosamina e à heparina e encontra-se elevado em condições associadas ao remodelamento da matriz extracelular. O YKL-40 foi descrito como importante marcador de doenças inflamatórias/fibrosantes, incluindo sarcoidose, artrite reumatóide, cirrose e placas ateroscleróticas. Em resumo, o YKL-40 é expresso em situações onde ocorre intenso remodelamento e reorganização da matriz extracelular, incluindo inflamação, degeneração articular e neoplasias (HORBINSKI *et al*, 2010).

2.5.2.3 TGF β 1

A fibrose hepática associa-se ao aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular, resultante do aumento da fibrogênese e diminuição da degradação (KANZLER *et al*, 2001). O TGF- β , particularmente o TGF- β 1, é a citocina profibrogênica mais bem caracterizada (DAMMEIER *et al*, 1998). O TGF- β é predominantemente secretado pelas células hepáticas estreladas em resposta ao dano hepático e torna mais intensa a expressão de genes que codificam as proteínas da matriz extracelular (PARADIS *et al*, 2002). Em modelos animais de fibrose hepática (infectados por *Schistosoma* e intoxicados com CCl₄-) demonstram-se a associação entre a expressão do TGF- β 1 e acúmulo de colágenos (DAMMEIER *et al*, 1998, LI *et al*, 2006). Evidência adicional para a atividade profibrótica do TGF- β 1 pode ser observada em animais transgênicos que apresentam super expressão de TGF- β 1 ativo no fígado (DOOLEY *et al*, 2003).

2.5.3 Estudos de marcadores não invasivos de fibrose hepática em esquistossomose

2.5.3.1 Estudos envolvendo o AH

Richard-Blum e colaboradores (1999) avaliaram 156 pacientes em Madagascar, foco hiperendêmico para a esquistossomose, utilizando diversos marcadores de fibrose e os compararam com o escore ultrassonográfico preconizado pela OMS (CAIRO WORKING GROUP, 1992). Os pacientes foram avaliados antes e após o tratamento com praziquantel. A prevalência de infecção descrita foi de 62%, e a esplenomegalia ocorreu em 69% dos pacientes. Os autores não informaram a idade dos pacientes incluídos nem a ocorrência de co-infecções. O AH foi dosado, pelo método de ensaio radiométrico. Dentre os pacientes, 56 não apresentavam imagem de fibrose à ultrassonografia, 63 apresentavam fibrose leve (escore 1) e 37 fibrose intensa (escore 2 ou 3). A concentração do AH mostrou boa correlação com o escore de fibrose adotado ($r = 0,505$; $p = 0,003$). Um ano após o tratamento, os níveis de AH sofreram redução significativa em relação aos níveis pré-tratamento e a correlação com a gravidade da fibrose foi mantida.

Observa-se também que no estudo de Hassanein et al. (1997), houve redução dos níveis séricos de ácido hialurônico em pacientes com a forma intestinal da esquistossomose tratados precocemente com praziquantel. Crianças e adolescentes residentes de uma área rural no Egito, portadores da forma intestinal da esquistossomose mansônica, foram avaliados em comparação com controles pareados procedentes de uma área urbana. O AH e o PIIP foram dosados antes e após o tratamento com praziquantel, utilizando o radioensaio. Os autores encontraram níveis mais elevados de AH em indivíduos infectados, em comparação com seus controles pareados ($p < 0,05$ para crianças e $p < 0,001$ para adolescentes). Os níveis foram reavaliados 4 e 8 semanas após o tratamento. Houve redução significativa tanto entre as crianças ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) quanto entre os adolescentes ($p < 0,001$ nas duas ocasiões). Ocorreu elevação dos níveis de PIIP em relação aos níveis pré-tratamento em crianças, 4 e 8 semanas após o tratamento ($p < 0,05$ e $p < 0,001$). A elevação dos níveis de AH nos

indivíduos infectados foi atribuída à maior produção do marcador em consequência do processo inflamatório granulomatoso.

No Senegal, Burchard e colaboradores (1998) estudaram marcadores bioquímicos de fibrose em comparação com a ultrassonografia em 153 pacientes com fibrose hepática esquistossomótica. Esse estudo não encontrou alterações nos níveis séricos de ácido hialurônico, laminina e PIIINP. Os marcadores foram dosados pelo método de ensaio radiométrico, apenas em adultos, escolhidos randomicamente em cada grupo. A prevalência da infecção esquistossomótica encontrada pelo exame de fezes foi de 81,5%. O diagnóstico da fibrose pela ultrassonografia foi dado por dois examinadores, de acordo com dois protocolos distintos (CAIRO WORKING GROUP, 1992; RICHTER *et al*, 1992). Houve concordância inequívoca entre os dois protocolos apenas para 12 pacientes portadores de fibrose considerada avançada por ambos os examinadores. Os níveis de AH estavam elevados em 26,8% dos casos. Porém, não houve correlação entre a elevação do marcador e a fibrose e a ultrassonografia, tanto na comparação com os critérios de fibrose como em comparação com a organometria. Dois fatores foram apontados para justificar a ausência de correlação do AH com o exame de imagem. Em primeiro lugar, as classificações ultrassonográficas de fibrose foram consideradas arbitrárias e possivelmente imprecisas para o diagnóstico da fibrose recente. Segundo, os autores sugeriram que a elevação do AH, bem descrita para outras doenças hepáticas, esteja mais correlacionada com as alterações da função hepática e com a hipertensão porta do que com a fibrose em si. Na análise desse estudo, no entanto, é preciso levar em conta que a introdução da doença na região em questão deu-se de forma epidêmica, menos de uma década antes da realização do estudo e que 60% dos pacientes apresentavam estágios precoces de acometimento hepático à ultrassonografia e apenas 3% dos pacientes apresentavam a forma hepatoesplênica.

Pascal e colaboradores (2000) avaliaram marcadores de estresse oxidativo e de fibrose no soro em 35 pacientes adultos de uma área endêmica no Sudão e compararam com a classificação ultrassonográfica descrita por Doehringer-Schwerdtfeger e colaboradores (1989). Trinta e cinco pacientes entre 18 e 50 anos foram incluídos. Os resultados foram comparados com dois grupos controles: um grupo de sudaneses composto de 27 homens residentes na região

endêmica, e um grupo de 24 pessoas residentes na Europa. Oito pacientes tiveram o grau de fibrose classificado como de grau II ou III, oito não apresentavam fibrose e 19 tinham fibrose leve (grau I) a ultrassonografia. O AH foi dosado pelo método radiométrico. Seus níveis foram maiores que nos controles sudaneses e europeus ($p < 0,01$). Pacientes com fibrose leve e moderada ou grave apresentaram concentração média de AH de 66 e 110 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Essas concentrações correlacionaram-se com a gravidade da fibrose detectada à ultrassonografia e com os níveis de peróxido de lipídeos, sugerindo uma associação entre a elevação do AH e os processos oxidativos em curso. Os autores descreveram as médias de concentrações dos grupos de fibrose hepática, sem identificar pontos de corte para o diagnóstico da sua presença e intensidade. Talvez por isso tenham relatado níveis tão elevados, comparáveis aos descritos para o diagnóstico de cirrose em comparação com esquistossomóticos (KÖPKE-AGUIAR *et al*, 2002). É possível também que o método de dosagem utilizado por Pascal e colaboradores (2000) apresente menor sensibilidade na detecção do marcador, resultando em concentrações médias mais elevadas.

Köpke-Aguiar e colaboradores (2002) utilizaram o método imuno-enzimático em sanduíche para a dosagem do ácido hialurônico em 24 pacientes de ambulatório com infecção crônica pelo *S.mansoni*, e comparou com sete pacientes cirróticos. Os pacientes esquistossomóticos foram classificados em grupos definidos ecográfica e endoscopicamente. Quinze pacientes apresentavam a forma leve, caracterizada pela ausência de varizes esofagianas ou esplenomegalia. Nove pacientes apresentavam a forma grave compensada, caracterizada pela presença de esplenomegalia e varizes esofagogástricas com ou sem gastropatia hipertensiva, mas sem ascite, icterícia ou encefalopatia. Os autores identificaram pacientes com a forma leve a partir de 20 $\mu\text{g/l}$ e níveis acima de 80 $\mu\text{g/l}$ diferenciaram os pacientes cirróticos dos pacientes com a forma grave da esquistossomose. A extrapolação dos dados desse estudo, no entanto, deve ser cautelosa, já que a amostra é composta por pacientes selecionados, atendidos em ambulatório de referência.

Eboumbou e colaboradores (2005) estudaram marcadores sorológicos de fibrose e do estresse oxidativo na diferenciação da injúria hepática crônica resultante da esquistossomose e das hepatites virais no Sudão. Os marcadores foram dosados em 50 pacientes residentes em uma

área endêmica, 24 controles sudaneses de área não endêmica e 34 franceses. Entre os pacientes, 15 não tinham fibrose a ultrassonografia, 21% tinham sorologia positiva para hepatite B e 4% para hepatite C. Enquanto os níveis de AH mostraram-se elevados e correlacionados com a fibrose a ultrassonografia, o malondialdeído, marcador do estresse oxidativo, mostrou valores elevados apenas nos pacientes portadores de hepatite viral ($p = 0,0001$ e $0,398$, respectivamente). Utilizando-se o exame de imagem como padrão ouro para o estudo da fibrose hepática, o AH correlacionou-se com a presença e gravidade da fibrose, sem sobreposição com o malondialdeído, marcador da presença de infecção viral.

Marinho e colaboradores (2010) estudaram os níveis séricos de ácido hialurônico e colágeno IV de 79 pacientes adultos com diagnóstico de esquistossomose e os associou à imagem da fibrose hepática à ultrassonografia. A ultrassonografia foi utilizada para diagnosticar e categorizar a fibrose hepática de acordo com os padrões da OMS (CAIRO WORKING GROUP, 1992). A ultrassonografia identificou seis pacientes com fibrose hepática intensa, 21 com fibrose hepática moderada, 23 com fibrose leve e 29 indivíduos sem fibrose. Nesse estudo o AH foi capaz de separar os pacientes com fibrose dos pacientes sem fibrose ($p < 0,001$) e os pacientes com fibrose leve daqueles com fibrose intensa ($p = 0,029$), mas não o colágeno IV ($p = 0,692$). A acurácia do diagnóstico de fibrose hepática pelo AH foi 0,89. O ponto de corte de 115,4 ng/ml diagnosticou pacientes com fibrose (sensibilidade 0,98; especificidade 0,64). Houve uma correlação positiva do AH com a hipertensão porta. A fibrose periportal (à avaliação subjetiva), idade e circulação colateral foram preditores do aumento do AH. A autora conclui que o ácido hialurônico pode ser utilizado em áreas endêmicas para esquistossomose para identificar os indivíduos com fibrose hepática.

2.5.3.2 Estudos envolvendo TGF- β

No estudo de Oliveira e colaboradores (2006) foram avaliados os níveis de produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, após a estimulação *in vitro* com SEA, SWAP ou PBMC em indivíduos de diferentes idades, sexo, com infecção variável e diferentes graus de fibrose. O uso da ultrassonografia abdominal permitiu a avaliação indireta da fibrose

hepática. Os resultados indicaram importante associação entre os níveis de IL-13 com fibrose periportal moderada ou grave. No entanto, TGF- β revelou associação negativa em relação à fibrose, o papel dessa citocina permanece indefinido e requer outras investigações. Nesse estudo havia 91 pacientes sendo que 55 pacientes (60,4%) apresentavam infecções por outros parasitas e 51 (56%) tinham ovos de *S.mansoni* nas fezes. Ao exame de ultrassonografia 47 indivíduos (51,6%) não tinham fibrose periportal e esse grupo foi denominado 0. Fibrose periportal incipiente ocorreu em 22 pacientes (24,2%) que formou o grupo 1, enquanto o grupo 2 teve 15 indivíduos (16,5%) que apresentavam fibrose moderada e 7 (7,7%) que apresentaram fibrose intensa. Os pacientes com fibrose moderada e grave foram incluídos no mesmo grupo por causa da baixa frequência da ocorrência de fibrose grave. No modelo A de avaliação, todos os pacientes que exibiam algum grau de fibrose (membros dos grupos 1 e 2) foram agrupados e comparados com os indivíduos sem fibrose (grupo 0) e a variável positivamente relacionada com a fibrose foi a IL-13 (OR=3,1). Em contraste TGF- β foi negativamente associado com a fibrose (OR=0,3); no entanto essa associação não ocorreu na análise univariada (P=0.280) apesar de uma associação na análise de regressão logística. No modelo B os pacientes do grupo 1 (fibrose incipiente) foram agrupados aos indivíduos sem fibrose (0) e comparados com aqueles que tinham fibrose moderada/intensa (2): somente a IL-13 teve relação positiva com a fibrose moderada/grave (OR=4). Finalmente no modelo C, no qual os pacientes sem fibrose (grupo 0) foram comparados aos indivíduos que apresentavam fibrose incipiente (grupo 1) e com aqueles com fibrose moderada/grave (grupo 2), ficou claro que a IL-13 está fortemente associada com a fibrose (OR=5,8) e que o TGF- β está inversamente associado a fibrose (OR=0,2). Nenhuma outra citocina avaliada mostrou associação significativa com a intensidade da fibrose em nenhum dos modelos testados pela análise multivariada. Observou-se que o grupo classificado como fibrose incipiente era constituído de indivíduos mais jovens do que os classificados como fibrose moderada/intensa, o que sugere uma progressão da doença do grupo 1 para o grupo 2. Nesse estudo observou-se que variáveis como idade, sexo, e taxa de infecção são confundidores e todos devem ser considerados no sentido de estabelecer associação entre a produção de citocinas e fibrose periportal (OLIVEIRA *et al*, 2006). Esse estudo de Oliveira e colaboradores (2006) nos trouxe algumas evidências da associação do TGF- β com a proteção contra a fibrose. No entanto, para o TGF- β o intervalo de confiança da OR ficou próximo de um, daí a força dessa associação com a fibrose requerer mais investigações. TGF- β é uma citocina pleiotrópica reconhecida pelo seu envolvimento na fibrose por induzir a deposição de colágeno (ZHU *et*

al, 2000). Nesse estudo altos níveis de TGF- β estavam aparentemente associados com baixos níveis de fibrose e com baixos níveis de OR – que promove uma boa estimativa do risco relativo – parece que o TGF- β tem um papel protetor no desenvolvimento da fibrose. Em outro estudo (DE JESUS *et al*, 2004), no entanto, não houve diferença entre os níveis de TGF- β em PBMC estimulado com SEA nos pacientes com diferentes graus de fibrose. Esses autores sugerem que a indução da fibrose pelo TGF- β seja intermitente: a produção intermitente dessa citocina foi demonstrada em babuínos infectados com *S. mansoni*, o que sugere uma associação com a fibrose (FARAH *et al*, 2000). Vários estudos indicam que o TGF- β é uma citocina regulatória produzida por células T e promove um mecanismo de controle eficaz na progressão da fibrose em associação com a IL-10 (HESSE *et al*, 2004, KITANI *et al*, 2003, REMOUE *et al*, 2001). Os resultados desse trabalho chamam a atenção para a elevada produção de IL-13 associada à fibrose moderada/grave e a associação entre a taxa de infecção e a ocorrência de fibrose incipiente em indivíduos em área endêmica para esquistossomose. Além disso, os dados mostram que o TGF- β não está associado positivamente à fibrose hepática, ao invés disso sustenta a hipótese de que a fibrogênese depende da IL-13, mas não depende do TGF- β (KAVIRATNE *et al*, 2004).

Morais e colaboradores (2010) realizaram um estudo cujo objetivo foi correlacionar os níveis de marcadores séricos com a fibrose e com a atividade necroinflamatória em pacientes com diagnóstico de hepatite viral C e esquistossomose. Nesse estudo foram incluídos 80 pacientes sendo que, 13 faziam parte do grupo controle, 39 tinham o diagnóstico de hepatite C, 19 pacientes tinham o diagnóstico de hepatite C e esquistossomose e 22 somente esquistossomose. Os pacientes submeteram-se à biópsia hepática por agulha, ultrassonografia abdominal, exame parasitológico de fezes e coleta de sangue para a dosagem dos marcadores. Os marcadores utilizados nesse estudo foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, bilirrubinas, γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), contagem de plaquetas, citocinas IL-13, IFN- γ , TNF- α e TGF- β . Os resultados apresentados mostram que o nível sérico das citocinas IL-13, IFN- γ , TNF- α e TGF- β não apresentaram significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Nos pacientes co- infectados o único marcador que foi capaz de diferenciar entre fibrose leve e grave foi a bilirrubina total ($p = 0,008$). Nos pacientes esquistossomóticos os níveis de GGT e AP encontravam-se mais elevados do que nos pacientes com diagnóstico de hepatite C. O aumento de GGT foi

relacionado à presença de granulomas no tecido hepático. Os níveis elevados de AP também foram associados à presença de granuloma no parênquima e à distorção da vasculatura (VIANNA *et al*, 1989). Esses granulomas poderiam eventualmente produzir compressão dos ductos biliares, elevando os níveis de GGT e essa enzima poderia ser um marcador precoce da hipertensão porta (KOPKE-AGUIAR *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2000).

2.5.3.3 Estudos envolvendo YKL40 e TGF β

A co-infecção esquistossomose e hepatite viral C é comum em alguns países (ANGELICO *et al*, 1997, CAPRON *et al*, 1992) e nesses casos a carga viral para o HCV é mais elevada, atividade inflamatória e fibrose mais avançada além da resposta ruim ao tratamento com interferon (ANGELICO *et al*, 1997). Os pacientes co-infectados apresentam uma evolução para fibrose hepática mais acelerada (KAMAL *et al*, 2001, 2004).

No estudo de Kamal e colaboradores (2006), utilizaram marcadores séricos de fibrose e citocinas profibrogênicas e pró-inflamatórias para predizer a diferença da progressão da fibrose utilizando uma coorte de progressão rápida (co-infectados) versus uma coorte de progressão lenta (HCV). Esse estudo indica que o YKL40 sérico e o TGF- β podem predizer com acurácia a progressão da fibrose ao longo de 8 a 10 anos nos pacientes com co-infecção esquistossomose e HCV e são também capazes de identificar os pacientes que não tiveram progressão da fibrose. Foram avaliados 87 pacientes, 39 apenas com infecção pelo HCV e 48 indivíduos coinfectados (HCV e esquistossomose). Os pacientes foram seguidos de forma prospectiva por 95 \pm 4,6 meses (média de 97-125 meses). Realizou-se a dosagem sérica de ALT, albumina, bilirrubina e tempo de protrombina dos pacientes à admissão e anualmente até o término do seguimento. Todos os pacientes submeteram-se a exame de ultrassonografia abdominal e endoscopia. Todos os pacientes realizaram também a biópsia hepática por agulha em torno de 8 a 10 meses após o início dos sintomas e outra biópsia no final do seguimento. As biópsias foram coradas com hematoxilina e eosina e por uma coloração para tecido conjuntivo e lidas por dois patologistas. Os níveis séricos de TGF- β , TNF- α , YKL-40 e propeptídeo aminoterminal do procolágeno III (PIIINP) foram dosados na entrada do paciente

e anualmente até o final do estudo. TGF- β e TNF- α foram marcados nas duas biópsias realizadas nos dois momentos descritos. Como resultado os autores apresentam que os pacientes co-infectados tinham títulos mais elevados de RNA HCV ($P < 0,01$). Diferente dos biomarcadores, a redução de plaquetas e de albumina somente foi observada em fases mais tardias, associadas ao desenvolvimento de fibrose. Não houve diferença entre os níveis de ALT ou de AST na primeira dosagem, durante o estudo ou no final. No final do estudo, praticamente todos os pacientes co-infectados apresentavam esplenomegalia e varizes esofagianas. Os pacientes co-infectados apresentaram progressão marcante da fibrose quando comparados aos monoinfectados. O aumento da fibrose nesse grupo foi estatisticamente significativo ($P < 0,001$). Na primeira dosagem, não houve diferença significativa entre o nível sérico de YKL40, PIII-NP e TGF- β em monoinfectados e co infectados. A taxa de elevação durante os dois primeiros anos foi comparável nos dois grupos. Os pacientes co-infectados tiveram aumento dos níveis de YKL-40 e TGF- β a partir do terceiro para o quarto ano de seguimento. Os níveis mais elevados de YKL-40 foram detectados nos pacientes que apresentaram piora da intensidade da fibrose. Os níveis de YKL40 e TGF- β parearam com grande significado estatístico ($r = +0,897$, $P < 0,001$). O pico de elevação do PIII-NP nos pacientes co-infectados ocorreu após 7 a 8 anos e a correlação entre esse marcador e o TGF- β foi mais fraca. Os níveis de TNF- α apresentaram elevação mais precoce, porém, com níveis flutuantes e não houve correlação com os níveis de YKL40 ou PIII-NP. Os níveis de TGF- β aumentaram com a gravidade do dano hepático e com a progressão da fibrose, o que foi marcadamente mais acelerado no grupo co-infectado. O TNF- α não teve relação com a progressão da fibrose, mas correlacionou em todos os pontos com o escore de atividade necroinflamatória. Houve uma correlação linear direta mais forte entre os níveis de YKL40 ($r = +0,892$, $P < 0,01$) e progressão da fibrose quando comparado ao nível de PIII-NP ($r = 0,577$, $P < 0,05$) sugerindo que o YKL40 deve ser mais eficiente que o PIII-NP na detecção precoce de fibrose e no monitoramento de sua progressão. Foram analisadas nas duas biópsias dos dois grupos de pacientes a expressão do TGF- β , TNF- α e YKL-40. Os níveis de expressão do RNA-m de TGF- β e YKL40 foram seis vezes maiores que os níveis basais somente nos co- infectados e foi maior naqueles que apresentaram fibrose mais avançada (KAMAL *et al*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Dosar os marcadores séricos de fibrose – ácido hialurônico (AH), YKL40 e fator de crescimento e transformação β 1 (TGF- β 1) – e determinar a sua importância no diagnóstico da esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

3.2. Objetivos específicos:

1. Dosar os níveis séricos de AH, TGF- β 1 e YKL40 em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e hepatointestinal;
2. Comparar os níveis séricos de AH, TGF- β 1 e YKL40 nos dois grupos estudados;
3. Correlacionar os níveis séricos de AH, TGF- β 1 e YKL40 em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com a intensidade da fibrose hepática avaliada pela biópsia hepática;
4. Correlacionar os níveis séricos de AH, TGF- β 1 e YKL40 em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com a intensidade da fibrose hepática avaliada pela ultrassonografia;
5. Correlacionar os níveis séricos de AH, TGF- β 1 e YKL40 em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com a intensidade da fibrose hepática avaliada pela ressonância magnética.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Protocolo do estudo

Trata-se de estudo transversal descritivo, analítico e comparativo, com coleta de dados entre julho de 2006 e julho de 2010.

4.2 Cálculo da amostra

Não há dados na literatura para o cálculo amostral do estudo proposto levando-se em conta a dosagem dos marcadores séricos (AH, TGF- β 1, YKL40) quando comparados ao padrão ouro – biópsia hepática em cunha. Dessa maneira foi selecionada uma amostra de conveniência composta por 30 indivíduos em cada um dos dois grupos.

4.3 Pacientes

Os 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica e com indicação de cirurgia encontravam-se em acompanhamento no ambulatório do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP Orestes Diniz). Durante o período de julho de 2006 a julho de 2010 eles foram examinados e selecionados para o estudo. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar e submeteram-se a anamnese, ao exame físico, ultrassonografia, endoscopia digestiva alta e ressonância magnética abdominal. Colheu-se amostra de sangue para a realização dos exames laboratoriais (hemograma e bioquímica) e uma amostra foi armazenada para a avaliação dos marcadores de fibrose. No momento da cirurgia realizou-se a biópsia hepática em cunha para a avaliação histológica qualitativa e quantitativa da fibrose. Preencheu-se questionário padronizado com todas as informações obtidas dos pacientes (APÊNDICE A).

O princípio cirúrgico fundamenta-se em dois parâmetros maiores: redução da pressão dentro do sistema porta ou nas varizes e a interrupção do fluxo porta para o território das varizes. O objetivo da cirurgia é tratar e prevenir o sangramento. A indicação cirúrgica deve ser ponderada com base no estado clínico do paciente e nesse grupo foram as seguintes: anemia grave secundária à esplenomegalia; risco de ruptura, espontânea ou traumática do baço devido à esplenomegalia muito volumosa; episódios de hemorragia digestiva.

Os 30 pacientes com diagnóstico de esquistossomose hepatointestinal foram provenientes de área endêmica (Sarzedo/MG) e o diagnóstico da helmintíase foi confirmado pelo exame parasitológico de fezes realizado em 3 amostras. A seleção dos pacientes deu-se em julho de 2007. Os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e submeteram-se à anamnese, exame físico, ultrassonografia abdominal e coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais (sorologia para hepatites virais, hemograma e bioquímica) e tiveram amostra armazenada para a posterior avaliação dos marcadores de interesse. Preencheu-se questionário padronizado com as informações obtidas dos pacientes (APÊNDICE A).

4.3.1 Critérios de inclusão

Grupo com diagnóstico de esquistossomose hepatoesplênica e hipertensão porta esquistossomótica: Selecionaram-se pacientes adultos (maiores de 18 anos) com história de exposição em área endêmica de esquistossomose. Realizou-se a documentação da infecção pelo exame parasitológico de fezes ou biópsia retal. Todos os pacientes receberam tratamento prévio para esquistossomose e estavam aparentemente curados da esquistossomose na ocasião do estudo. A ultrassonografia abdominal confirmou o diagnóstico de hipertensão porta de provável etiologia esquistossomótica. Todos tinham critérios para intervenção cirúrgica abdominal e encontrava-se em acompanhamento nos Ambulatórios de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Grupo de Cirurgia do Fígado da Universidade Federal de Minas Gerais ou

Equipe de Cirurgia de Fígado e Vias Biliares da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

Não foram incluídos no estudo os pacientes com os seguintes diagnósticos:

- hepatopatia fibrosante de outras causas;
- insuficiência hepática e/ou evidência de cirrose hepática;
- insuficiência cardíaca congestiva;
- exposição a drogas hepatotóxicas (metildopa, metotrexate, isoniazida, amiodarona, quimioterapia);
- abuso de álcool no último ano: ingestão de mais de 60 g de álcool por dia – 140 mL de aguardente de cana ou duas garrafas de cerveja;
- hepatites virais B e C.

Grupo com diagnóstico de esquistossomose hepatointestinal: Selecionaram-se pacientes adultos (maiores de 18 anos) com história de banho em águas naturais de área endêmica para a helmintíase – Sarzedo/MG. Realizou-se a documentação da infecção pelo exame parasitológico de fezes em três amostras. Não incluídos no estudo os indivíduos com mesmos diagnósticos do grupo anterior.

4.3.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se do estudo os pacientes que apresentaram:

- Evidência histológica de hepatopatia fibrosante de outra etiologia (dois casos);
- Biópsia hepática insuficiente para a análise histológica (quatro casos);
- Impossibilidade de avaliação do paciente por exames de imagem (seis casos);
- Impossibilidade de realização de marcadores séricos (dois casos).

Ver figura 6 a seguir – Fluxograma do estudo.

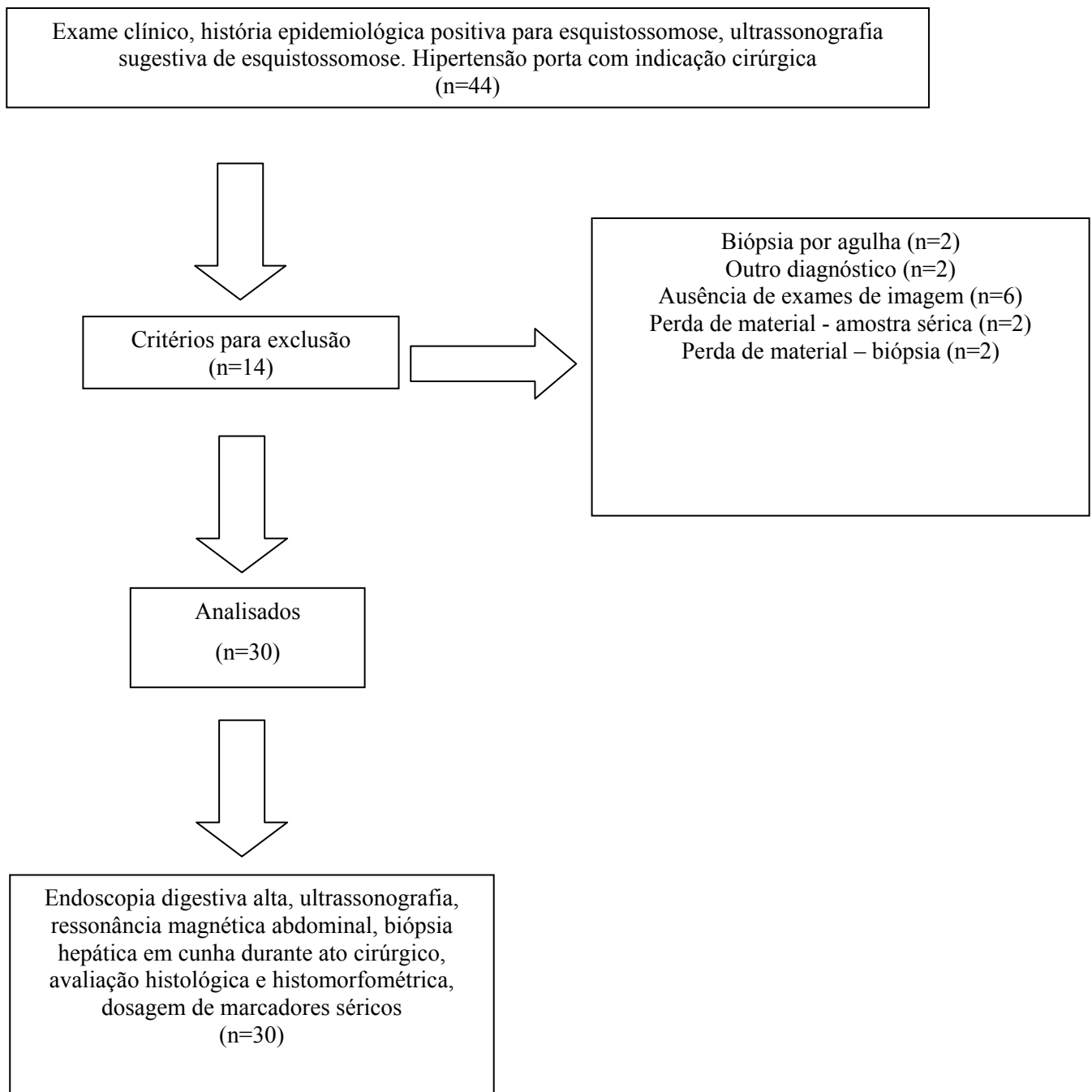


FIGURA 6- Fluxograma do estudo dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica realizado no período de julho de 2006 a julho de 2010, Belo Horizonte - MG

4.3.3 História clínica

Os pacientes foram examinados pela autora. Durante a entrevista, eles expressaram espontaneamente suas queixas e foram indagados especificamente sobre a história de exposição a águas naturais, realização de exames prévios para o diagnóstico de esquistossomose, história de tratamento anterior para a helmintíase, episódios de hemorragia digestiva, uso de álcool, drogas ilícitas ou medicamentos, história de eritema malar, artrite, ascite, ortopnéia ou dispnéia paroxística noturna, passado de escleroterapia ou ligadura elástica das varizes do trato digestivo alto e história prévia de cirurgia para correção de hipertensão porta.

4.3.4 Exame físico

Ao exame físico foram registrados dados da ectoscopia, peso, altura e dados vitais. Palpou-se o abdome com o paciente em decúbito dorsal em respiração espontânea. O fígado e o baço foram classificados em “palpável” e “não palpável”. Mediu-se em centímetros a distância entre a borda inferior do fígado palpável e o apêndice xifóide e o rebordo costal direito. A distância entre o baço palpável e o rebordo costal esquerdo foi medida em centímetros em relação ao ponto mais caudal do limite do órgão. Investigou-se circulação colateral na parede abdominal e estigmas de insuficiência hepática (ginecomastia, aranhas vasculares, telangiectasias), assim como sinais de insuficiência cardíaca (desvio de *ictus cordis*, bulhas acessórias, sopros, crepitações pulmonares, edema periférico).

4.4 Exames laboratoriais

Realizaram-se análises de amostras de sangue com o objetivo de se identificar hiperesplenismo e de se avaliar a função hepática: hemograma, atividade de protrombina, albumina, aspartatoaminotransferase (AST), alaninoaminotransferase (ALT) e gama glutamil

transferase (GGT). Utilizaram-se técnicas laboratoriais convencionais adotadas pelo Laboratório Central do HC-UFMG para a execução dos exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos (HBsAg, anti-HBc total, anti-HCV, VDRL, anti-HIV).

4.5 Exames de imagem

Ultrassonografia: O exame ultrassonográfico do abdome foi realizado nos dois grupos pelo médico radiologista Leonardo Queiroz. O radiologista é experiente e treinado para a realização do protocolo da OMS (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). Para a avaliação dos pacientes do grupo com diagnóstico da forma hepatoesplênica utilizou-se o aparelho ALOKA SSD 1700 *Dynaview* (ALOKA CO., Japão) com transdutores lineares eletrônicos de 3,5 MHz. Para a avaliação dos pacientes com a forma hepatointestinal utilizou-se aparelho portátil *GE Logic Book* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), com transdutor convexo polifrequencial de 2,5 a 5 MHz. O examinador postou-se à direita do paciente, o qual foi examinado em decúbito dorsal, em inspiração máxima, respeitando-se as orientações da OMS.

Ressonância magnética: Os exames de ressonância magnética abdominal foram realizados e analisados pela médica radiologista Luciene Mota, experiente na realização do exame e conhecedora do protocolo da OMS (NIAMEY WORKING GROUP, 2000) o qual foi aplicado também na avaliação por esse método de imagem. Os exames realizaram-se no Laboratório Hermes Pardini e no ECOAR. Adotou-se o sistema magnético supercondutor *General Electric* (GE) 1.5 tesla (Sigma; *General Electric Medical Systems*, Milwaukee, WIS, USA), com bobina de corpo de oito canais (*phased-array*). Foram adquiridas as seguintes sequências:

- Sequências axiais gradiente ecoponderadas em T1 “em fase” e “em oposição de fase” em inspiração máxima sustentada (*T1-weighted in phase and out-of-phase breath-hold spoiled gradient-echo*). Empregaram-se tempo de repetição (TR) de 90 a 200ms e tempo de eco (TE) de 2,1 ms para as imagens axiais ponderadas em T1 “em oposição de fase” e TE de 4,2 ms para as imagens ponderada em T1 “em fase”. As imagens foram obtidas com ângulo de inclinação (*flip angle*) de 70° a 90°, espessura de corte de 7 mm, intervalo entre os cortes (*intersection gap*) de 1mm, matriz de 256x128 a 192 e campo de visão (Field of view) de 32 a

40 cm. Adquiriu-se o sinal de uma única vez. Sequências de duplo eco foram utilizadas em todos os pacientes.

- Sequências axiais e coronais ponderadas em T2 com e sem saturação de gordura, sincronizadas com a respiração, sem necessidade de apnéia (*single-shot fast spinhecho non-breath-hold respiratory-triggered imaging*). Para estas sequências, utilizaram-se os seguintes parâmetros: TR/TE de 1800/100, espessura de corte de 7mm, intervalo de cortes de 1mm, matriz de 256 x 192 a 224 e campo de visão de 32 a 40 cm. O sinal foi adquirido uma única vez. A saturação de gordura foi aplicada usando-se seleção de frequência manual.

- Sequências axiais rápidas com ponderação em T2 durante expiração máxima sustentada (*FRFSE 3D fast imaging steady-state acquisition – FIESTA GE Medical Systems*), com os seguintes parâmetros: TR/TE de 3,7/1,6, ângulo de inclinação de 45°, espessura de corte de 7mm, intervalo entre cortes de 1mm, matriz de 320 x 256 e campo de visão de 40 cm. O sinal foi adquirido uma única vez.

- Sequências axiais e coronais volumétricas tridimensionais com ponderação em T1 e supressão de gordura, em sustentação de expiração máxima, chamadas LAVA (*Liver Acquisition with Volume Acceleration; GE Medical Systems*). Para as mesmas adotaram-se os seguintes parâmetros: TR/TE de 4,5/2,2, ângulo de inclinação de 12° e matriz de 320 x 224. A espessura do corte variou de 160 a 200mm, para garantir a cobertura completa do fígado. Em todos os pacientes esta sequência foi realizada antes e após a injeção endovenosa de gadolínio (gadopentetato de dimeglumina) na dose de 0,1 mmol/kg. A primeira aquisição foi na fase arterial hepática, repetindo-se duas vezes posteriormente com intervalos de 45 segundos para as fases venosa e de equilíbrio, seguida de uma aquisição coronal. Novas imagens foram adquiridas na fase tardia cinco minutos após a administração endovenosa do meio de contraste.

Cada exame de RM foi avaliado para a presença de fibrose periportal e alterações morfológicas locais e difusas do fígado. A fibrose periportal foi definida como a verificação de bandas hipointensas nas sequências ponderadas em T1 e hiperintensas em T2 ao longo dos tratos portais, sofrendo realce após a administração de contraste endovenoso. A fibrose foi graduada qualitativamente em leve, moderada e grave e também classificada de acordo com uma adaptação das pranchas da OMS para a ultrassonografia (FIGURA 7) (SILVA, 2010):

- A: normal;
- B: focos ecogênicos difusos em ramos portais periféricos (céu estrelado);

- C: espessamento hiperecogênico periportal periférico (os cortes transversais assemelham-se a anéis e os longitudinais a tubos);
- D: espessamento hiperecogênico periportal central;
- Dc: espessamento hiperecogênico periportal central e periférico;
- E: espessamento hiperecogênico periportal central com ramificações ecogênicas expandindo-se para o parênquima;
- Ec: espessamento hiperecogênico periportal central com ramificações ecogênicas expandindo-se para o parênquima, associado a espessamento periportal periférico;
- F: espessamento periportal periférico e central muito acentuado; grossas faixas ecogênicas partem da região central e atingem a periferia do órgão retraíndo-a;
- X: cirrose;
- Y: esteatose;

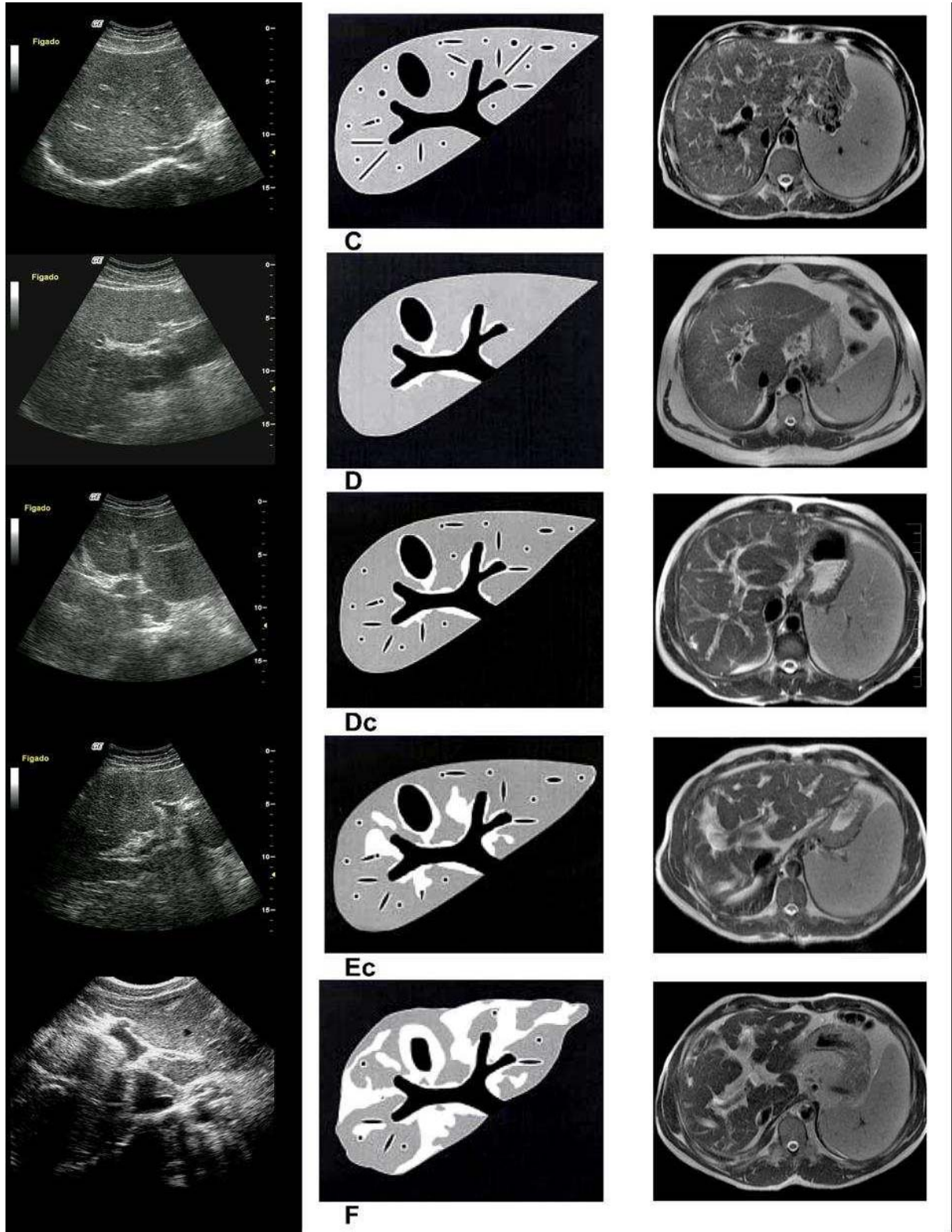


FIGURA 7 – Adaptação dos padrões ultrassonográficos de imagem hepática para RM. Originais por SILVA, L.C.S. *et al.* Esquistossomose mansônica: análise de ressonância magnética de fibrose hepática de acordo com o padrão da OMS para avaliação ultrassonográfica da morbidade em Esquistossomose. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010.

4.6 Cirurgia

As cirurgias dos pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose foram realizadas no Hospital das Clínicas da UFMG e na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e conduzidas pelos Profs. Andy Petroianu e Vivian Resende. Em todos os casos o procedimento proposto foi esplenectomia subtotal ou total com implante do baço no omento combinada com desconexão portavazites, perigástrica e periesofágica, além de sutura direta de varizes gástricas por meio de gastrotomia.

4.7 Biópsia hepática

No final de todas as operações, efetuou-se a biópsia hepática em cunha do lobo esquerdo do fígado. O fragmento foi colhido, com dimensão aproximada de 3cm³, e dividido em dois segmentos iguais: um introduzido em frasco contendo solução de formaldeído a 4% (formol a 10%) e o outro conservado em frasco contendo solução de cloreto de sódio a 0,9%. O segundo fragmento foi incluído em TISSUE-TEK®, congelado em nitrogênio líquido e mantido em botijões para análise posterior de marcador de fibrose na biópsia.

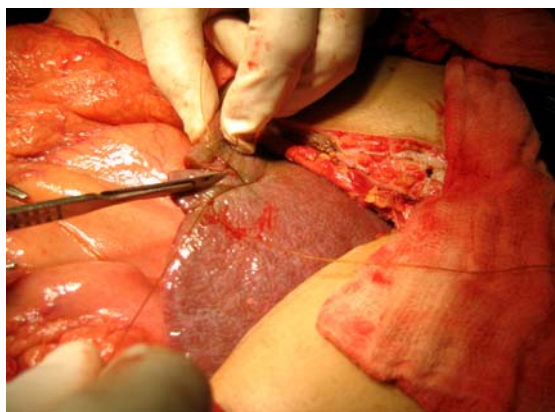


FIGURA 8- Aspecto macroscópico do fígado e realização de biópsia hepática (VOIETA *et al*, 2010)

4.7.1 Análise histológica

A análise histológica foi feita pelo Professor Zilton de Araújo Andrade e pela autora no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Salvador/BA). Estudaram-se lâminas de tecido hepático coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo picrossírius-vermelho para colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Ao exame qualitativo classificaram-se os pacientes em grau leve, moderado e intenso. Para tal avaliação foram levadas em conta as lesões presentes nos espaços porta, como: intensidade da fibrose, com emissão ou não de septos fibrosos; lesões nas paredes da veia porta de médio e de pequeno calibre; comportamento dos vasos arteriais; proliferação de ductos e ductulos biliares; inflamação; presença de elementos parasitários. No parênquima procurou-se por lesões de atrofia e de regeneração (presença de nódulos); traves espessas; espessamento fibroso peri-sinusoidal.

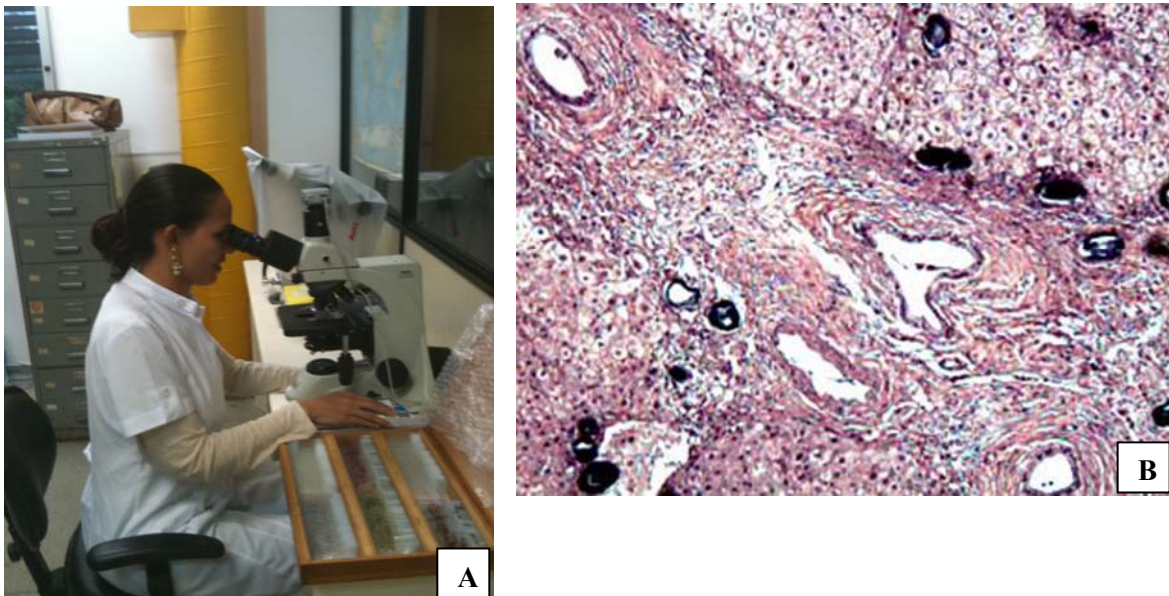


FIGURA 9 - A. Avaliação histológica realizada na Fundação Gonçalo Moniz, B. Biópsia hepática corada com HE – aumento 10x, mostrando fibrose septal fina associada a ovos calcificados e enfileirados ao longo do tecido fibroso

Fonte: do autor

4.7.2 Análise histomorfométrica

A classificação quantitativa da fibrose hepática realizou-se no laboratório de Microbiologia experimental no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Salvador/BA pela autora sob a supervisão de técnico treinado no manuseio do programa. Para a análise, utilizaram-se fragmentos de fígado obtidos por biópsia hepática cirúrgica; os fragmentos foram cortados, obtendo-se amostras de 5 µm que foram coradas com picrossírius-vermelho para colágeno. As lâminas coradas foram analisadas pelo sistema computadorizado de análise de imagens, constituído da videocâmera Olympus Q – Color 5, acoplada ao microscópio óptico Olympus (BX 51), com objetivas pancromáticas que transmitiram as imagens para o computador utilizando o software Image-Pro-Plus.

Para a realização da morfometria, os cortes foram medidos, utilizando objetiva de 10x. Cada campo contendo fibras colágenas foi capturado pelo sistema de imagens. A intensidade do vermelho de cada imagem foi medida automaticamente por diferença colorimétrica. O analisador fornece ao sistema o padrão da cor a ser quantificado e o sistema identifica a cor, preenche a área de interesse e processa a mensuração em pontos. Os resultados das medidas morfométricas das áreas de colágeno foram apresentadas em números absolutos (pontos), utilizando-se a média de cinco medidas por paciente.

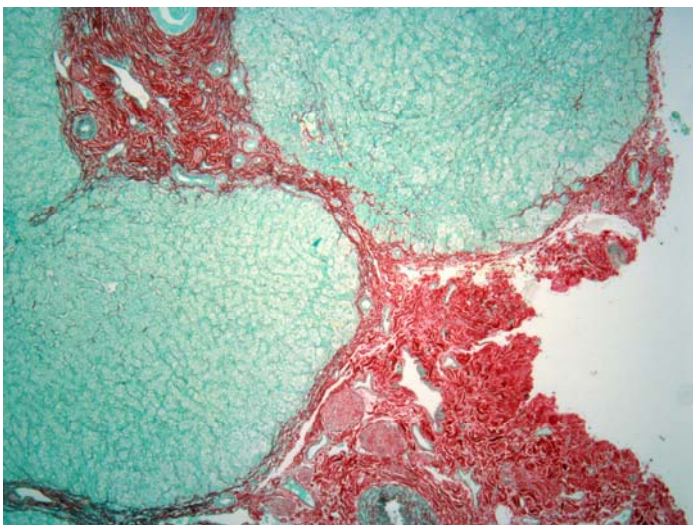


FIGURA 10 - Biópsia hepática em lâmina histológica. Coloração Picrossírius vermelho – 10x. Fibrose hepática corada de vermelho. Fonte: do autor

4.8 Dosagem dos marcadores séricos

Foram colhidos cinco a 10ml de sangue de cada paciente por punção venosa realizada por profissional treinado. O material foi separado por centrifugação, dividido em até três alíquotas e estocado sob refrigeração adequada. As dosagens dos marcadores de fibrose foram realizadas no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para a análise, as alíquotas foram deixadas em temperatura ambiente até o descongelamento. A concentração dos marcadores foi medida usando kits de ELISA sanduíche de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante.

Dosagem do AH: kit comercial HA-ELISA (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, EUA).

Dosagem do YKL40: kit comercial Human Chitinase 3-like 1. R&D Systems, Inc

Dosagem do TGF- β 1: kit comercial Quantikine Human TGF- β 1. R&D Systems, Inc

4.9 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas, utilizou o software *R Project for Statistical Computing*, versão 2.14.0 (disponível em <http://www.r-project.org/>). Inicialmente, realizou-se análise descritiva das variáveis utilizadas no estudo. Para as variáveis quantitativas, foram utilizadas medidas de tendência central e de variabilidade. Para as variáveis qualitativas foram construídas tabelas de distribuição de frequências. Para quantificar a concordância entre os três métodos (ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia - avaliação subjetiva) foi utilizado o coeficiente de concordância Kappa. A associação entre os resultados de histomorfometria e os marcadores AH, YKL-40 e TGF β -1 realizou-se por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Outras associações entre variáveis categóricas foram avaliadas por meio do Teste de Fisher. Os diagnósticos de fibrose foram classificados sob três perspectivas: ausente x presente; ausente/leve x moderada/grave; ausente, leve, moderada e grave. Para

descrever a natureza e o padrão das associações desses resultados com os marcadores de fibrose e o diagnóstico de fibrose hepática foram construídos modelos de regressão logística univariados e múltiplos e obtidas medidas de sensibilidade e especificidade, taxa de aumento da probabilidade de um diagnóstico positivo (Odds Ratio) e construção de curvas ROC.

Para a correlação de Pearson utilizou-se a classificação: 0,70 para mais ou para menos = forte correlação; 0,3 a 0,7 para mais ou para menos = correlação moderada; 0 a 0,3 fraca. Para o coeficiente Kappa utilizou-se a classificação de Landis e Koch (1977): <0 pobre; 0-0,19 desprezível; 0,2-0,39 leve; 0,4-0,59 moderada; 0,6-0,79 grande; 0,8-1,0 quase perfeita.

4.10 Considerações éticas

Os pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Grupo de Fígado da Universidade Federal de Minas Gerais e Equipe de Cirurgia de Fígado e Vias Biliares da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte durante o período do estudo, e os pacientes com diagnóstico da forma hepato intestinal procedentes de Sarzedo/MG, e que preencheram os critérios de inclusão, foram convidados a participar. Os objetivos, metodologia simplificada, riscos e benefícios da participação foram explicados a todos os pacientes, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A autora leu o termo de consentimento (APÊNDICE B), esclareceu dúvidas e o entregou aos pacientes. Eles também foram informados de que poderiam obter informações ou esclarecimentos ao longo da pesquisa e cancelar seu consentimento de participação, abandonando o estudo a qualquer momento. Souberam também que a identificação de determinadas doenças durante a propedêutica poderia os excluir automaticamente do estudo. Foram comunicados de que os dados provenientes da pesquisa seriam apresentados à comunidade científica, entretanto, sem sua identificação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ANEXO B).

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva

5.1.1 Características dos pacientes

De 60 indivíduos selecionados para o estudo (30 com EHE e 30 com EHI), 38 eram homens (63,3%), com média de idade de 38,1 anos ($\pm 11,2$). De 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica, fibrose hepática e indicação cirúrgica, 23 eram homens (76,7%), com média de idade de 39,2 anos ($\pm 9,7$). De 30 pacientes com EHI, 15 eram homens (50%), com média de idade de 35,5 anos ($\pm 12,7$).

Os valores de IMC (índice de massa corporal) e plaquetas dos pacientes dos dois grupos estão resumidos na tabela a seguir (TABELA 1).

5.1.2 Marcadores de fibrose

A análise descritiva dos marcadores séricos relacionados com a classificação da intensidade da fibrose dada pelos métodos de imagem e pela biópsia hepática está apresentada na TABELA 2.

TABELA 1

Valores de IMC e plaquetas de 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica e 30 pacientes com esquistossomose hepatointestinal avaliados neste estudo no período de julho de 2006 a julho de 2010

	Estatística	Hipertensão porta	Hepatointestinal
Plaquetas (mm ³)	Média	87.680	229.266
	Mediana	62.000	225.500
	Desvio-padrão	86.419	45.543
	Mínimo	24.000	157.000
	Máximo	376.000	366.000
IMC (kg/m ²)	Média	23,5	25,30
	Mediana	23,5	25,50
	Desvio-padrão	2,21	3,86
	Mínimo	18,00	18,00
	Máximo	27,00	37,00

TABELA 2

Características dos marcadores séricos de fibrose dos 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica e sua relação com a intensidade da fibrose hepática avaliada pela ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática – Faculdade de Medicina – UFMG, período de julho de 2006 a julho de 2010.

Intensidade da fibrose	Estatística	US_INT			RM_INT			Biópsia		
		AH	YKL-40	TGFβ-1	AH	YKL-40	TGFβ-1	AH	YKL-40	TGFβ-1
Ausente/ Leve	N			8			10			8
	Média	49,29	35,15	12,33	44,39	35,06	10,63	23,79	37,10	12,59
	Mediana	19,94	28,96	4,03	19,94	28,96	3,90	18,28	31,10	4,65
	Desvio-padrão	69,93	24,61	21,16	62,56	21,33	19,00	17,61	22,93	21,03
	Mínimo	6,94	11,39	2,24	10,05	20,00	2,24	9,12	20,00	2,24
	Máximo	217,09	90,51	63,91	217,09	90,51	63,91	51,70	90,51	63,91
Moderada/ Intensa	N			22			20			22
	Média	100,56	53,71	5,95	108,14	55,62	6,16	109,83	53,01	5,85
	Mediana	28,78	34,82	4,18	39,09	39,51	4,31	41,65	35,51	4,09
	Desvio-padrão	155,91	48,40	3,94	161,87	50,55	4,08	156,53	48,94	4,00
	Mínimo	8,24	9,24	1,20	6,94	9,24	1,20	6,94	9,24	1,20
	Máximo	630,86	175,95	15,63	630,86	175,95	15,63	630,86	175,95	15,63

*Unidade de medida AH, YKL 40, TGFβ1 - pg/ml

AH=ácido hialurônico; TGFbeta1: Transforming growth factor beta 1; US_INT=intensidade da fibrose avaliada pelo ultrassom; RM_INT=intensidade da fibrose avaliada pela ressonância magnética; Biópsia=intensidade da fibrose avaliada pela biópsia hepática.

5.1.3 Aspecto macroscópico do fígado dos pacientes com hipertensão porta esquistossomótica durante o ato cirúrgico

Os 30 pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica apresentavam características variadas da superfície do fígado no momento cirúrgico. Observaram-se fígados com superfície lisa a bocelada e com traves fibróticas evidentes. As bordas apresentavam-se cortantes e de consistência normal a espessadas e endurecidas (APENDICE C).

5.1.4 Aspectos histológicos do fígado dos pacientes com diagnóstico de hipertensão porta esquistossomótica

À microscopia, os 30 pacientes apresentavam algum grau de fibrose hepática periportal. Observou-se que o tecido fibroso era frouxo ou desorganizado em grande parte dos casos. Os granulomas não foram vistos na maioria das lâminas e, quando observados, eram poucos e pequenos. A atividade inflamatória foi classificada como leve ou ausente. Observou-se a preservação das estruturas biliares e arteriais. A capilarização dos sinusóides era inexpressiva (APENDICE D).

5.2 Comparação entre as medianas dos valores de marcadores não invasivos entre os grupos de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e esquistossomose hepatointestinal

Os níveis séricos do AH no grupo de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica foram significativamente maiores do que no grupo de pacientes com esquistossomose hepatointestinal ($p = <0,0001$). A distribuição dos valores de TGF- β 1 foi maior no grupo de pacientes com esquistossomose hepatointestinal (TGF- β 1: $p = 0,0001$). A distribuição dos níveis séricos do YKL40 não foi diferente nos dois grupos (YKL40: $p = 0,1342$) (Teste de Mann Whitney - TABELA 3).

TABELA 3

Comparação entre as medianas dos valores de marcadores não invasivos de fibrose (AH, TGF-B1 e YKL40) nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e hepatointestinal avaliados no período de julho de 2006 a julho de 2010.

	Estatística	AH	YKL40	TGF-β1
Esquistossomose hepatoesplênica (n=30)	Média	86,89	48,77	7,65
	Mediana	25,48	32,32	4,18
	Desvio padrão	138,98	43,73	11,29
	Mínimo	6,94	9,24	1,20
	Máximo	630,86	175,95	63,91
Hepatointestinal (n=30)	Média	12,01	56,98	48,26
	Mediana	10,49	45,15	43,38
	Desvio padrão	6,29	50,88	22,58
	Mínimo	5,56	16,57	18,94
	Máximo	35,43	289,03	117,21

Teste de Mann Whitney

Unidade de medida AH, YKL40 e TGF β1 - pg/ml

5.3 Análise univariada e Análise múltipla

Para a regressão logística as variáveis analisadas foram a presença ou ausência da fibrose dada pela ultrassonografia, dosagem dos marcadores séricos AH, YKL 40 e TGF β1 e IMC (índice de massa corporal). Foram analisados os 30 pacientes com esquistossomose hepatointestinal e 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

Na análise de regressão logística univariada o AH esteve marginalmente associado à presença de fibrose hepática ($p=0,066$). O TGF-β1 esteve fortemente associado à ausência de fibrose ($p=0,003$). O YKL40 não apresentou p significativo.

Na análise de regressão logística múltipla o único marcador que se manteve associado significativamente com a ausência de fibrose foi o TGF-β1. A variação de p pode ser

visualizada na tabela 4. O p do AH mostra a perda da significância desse marcador na presença do TGF- β 1 (0,066 – 0,852).

TABELA 4

Regressão logística univariada e regressão logística múltipla dos 60 indivíduos avaliados no período de julho de 2006 a julho de 2010.

Regressão logística univariada - Fibrose Ausente x Presente					Regressão logística múltipla - Fibrose Ausente x presente				
US/Int	OR	95,0% .IC OR		p	US/Int	OR	95,0% IC.OR		p
		LI	LS				LI	LS	
AH	1,018111	0,9988116	1,037783	0,066	AH	0,999	0,991	1,008	0,852
YKL40	,9957808	,9841303	1,007569	0,481	YKL40	0,990	0,965	1,017	0,466
TGF- β 1	0,7402512	0,6082515	0,9008968	0,003	TGF- β 1	0,726	0,578	0,912	0,006

Analisando o IMC como fator confundidor da fibrose obteve-se a OR menor que 1 e o p menor que 0,05, o que indica que quanto maior o IMC, menor a chance de ocorrência de fibrose. Entretanto, sabe-se que a explicação mais provável é que os pacientes com fibrose estavam em uma fase evolutiva crônica, com maior tendência à desnutrição do que os pacientes com esquistossomose intestinal. Utilizando-se os 3 modelos de regressão logística múltipla para os marcadores, nos modelos 1 e 2 (IMC e YKL40 / IMC e TGF β 1) não se observa modificação de efeito – o IMC não é confundidor dos resultados. No modelo 3 (AH e IMC) o AH torna-se significativo – $p=0,039$ - entretanto o coeficiente permanece semelhante (1,019385). Ou seja, o efeito do IMC sobre o AH é apenas estatístico, sem qualquer significância clínica.

5.4 Curvas ROC – marcadores séricos e biópsia hepática

Os marcadores avaliados não discriminaram adequadamente os pacientes com relação à intensidade da fibrose classificada pelo patologista. Apesar disso, o AH foi o marcador que apresentou maior tendência para essa discriminação. Para o AH: área=0,6818; (IC_(95%) = (0,49097; 0,87267); $p=0,133$. O YKL40 apresentou área=0,5114 ($p=0,925$) e o TGF- β 1

área=0,4489 ($p=0,673$). O Gráfico abaixo apresenta a curva ROC para o AH, YKL40 e TGF-B1.

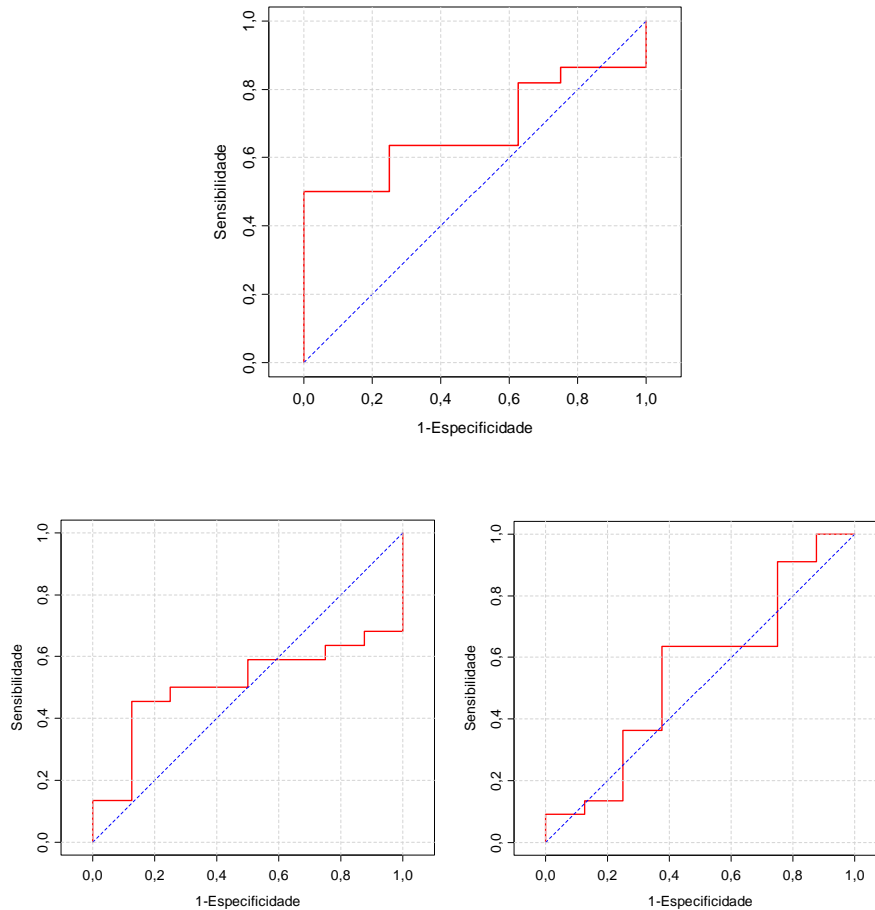


GRÁFICO 1: Curva ROC 1 (acima) - Avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e nível sérico de AH. Área=0,6818; $IC_{(95\%)} = (0,49097; 0,87267)$; valor $p=0,133$; curva ROC 2 (abaixo à esquerda). Avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e nível sérico YKL40 - Área = 0,5114 ; $IC_{(95\%)} = (0,29929 ; 0,72344)$ $p = 0,925$; curva ROC 3 (abaixo à direita) - avaliação da intensidade da fibrose por biópsia hepática e TGF- β 1 - Área = 0,4489 ; $IC_{(95\%)} = (0,4489 ; 0,4489)$ $p = 0,673$

5.5 Análise da correlação entre a histomorfometria e os marcadores não invasivos de fibrose - AH, TGF β -1 e YKL-40.

Houve correlação moderada dos níveis séricos de AH com a histomorfometria ($\rho=0,485571$; valor $p= 0,006526$) e correlação fraca com os outros marcadores (Pearson) (Gráfico 2).

- ✓ Histomorfometria x AH: $\rho = 0,485571$; $p = 0,006526$
- ✓ Histomorfometria x YKL-40: $\rho = 0,3116637$; $p = 0,09363$
- ✓ Histomorfometria x TGF β -1: $\rho = -0,3021534$; $p = 0,1046$

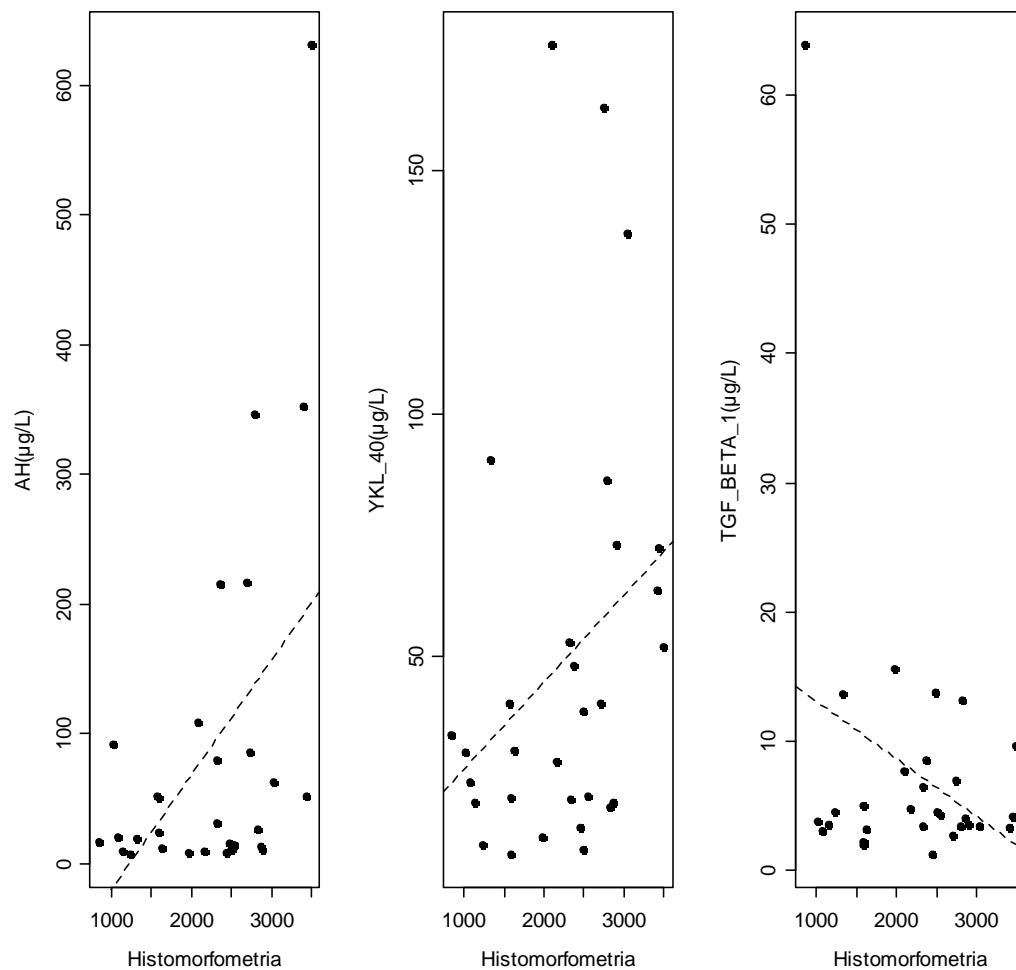


GRÁFICO 2: Análise da correlação entre a histomorfometria e os marcadores não invasivos de fibrose (AH, TGF- β 1, YKL40).

5.6 Curvas ROC – Marcadores séricos e ultrassonografia

Curva ROC dos marcadores séricos de fibrose utilizando-se a ultrassonografia para o diagnóstico da fibrose periportal.

O AH foi o melhor marcador da presença de fibrose avaliada pela ultrassonografia enquanto que o TGF- β 1 foi o melhor marcador da ausência de fibrose hepática (Gráfico 3). O YKL40 não separou os dois grupos.

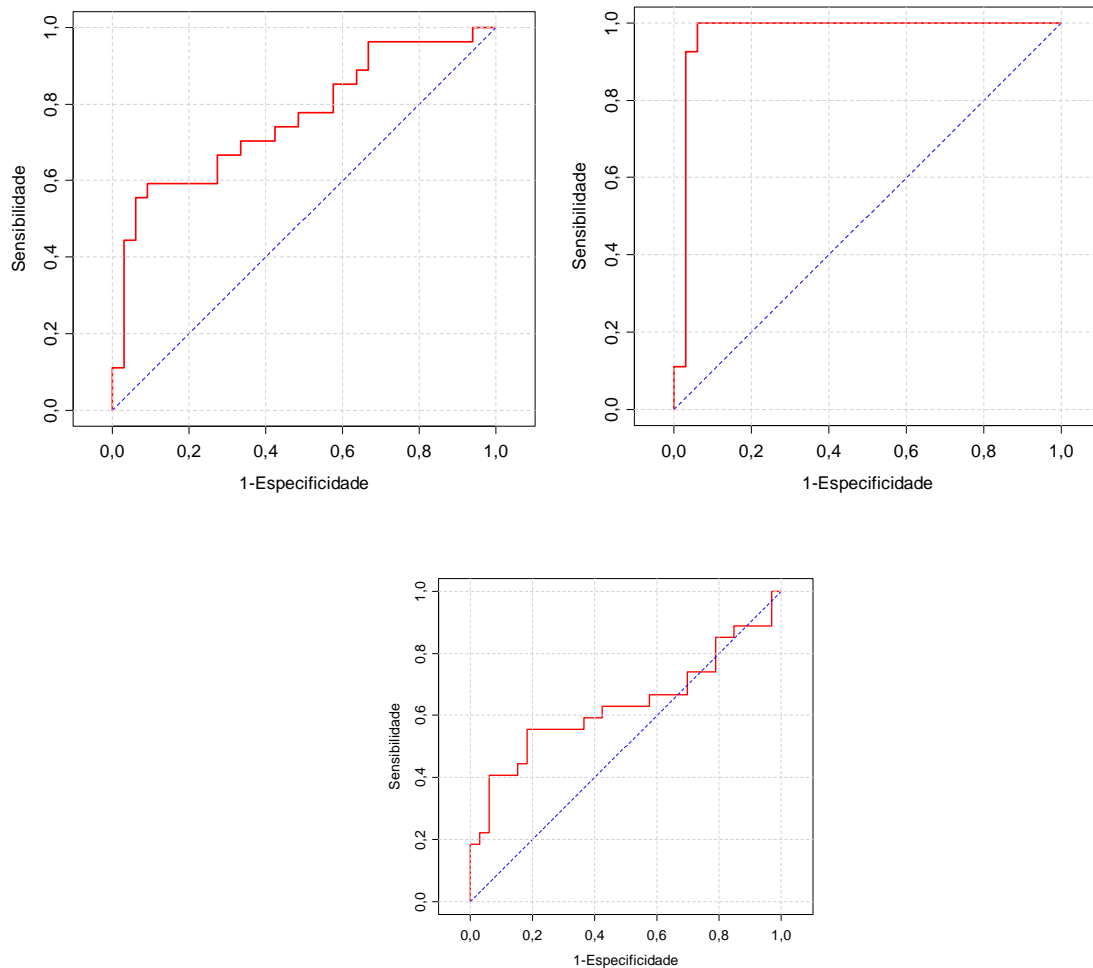


GRÁFICO 3: Curvas ROC: Curva 1 (esquerda) - nível sérico de AH e avaliação da fibrose por ultrassonografia - Área=0,76318; IC_(95%) = (0,6387;0,8876); p=0,00049; curva 2 (direita) - nível sérico de TGF- β 1 na avaliação da fibrose por ultrassonografia Área=0,9708; IC_(95%) = (0,9183;1,023); p<0,005; curva 3 (abaixo) – nível sérico de YKL 40 e avaliação da fibrose por ultrassonografia - Área = 0,63 ; IC_(95%) = (0,4818 ; 0,7811); p = 0,078

5.7 Curvas ROC – Marcadores séricos e ressonância magnética

Curva ROC dos marcadores séricos (AH, TGF- β 1, YKL40) em 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica utilizando-se a ressonância magnética para a classificação da intensidade da fibrose (ausente, leve, moderada, intensa). Os marcadores não

discriminaram os pacientes com relação à intensidade da fibrose utilizando-se a ressonância magnética (Gráfico 4).

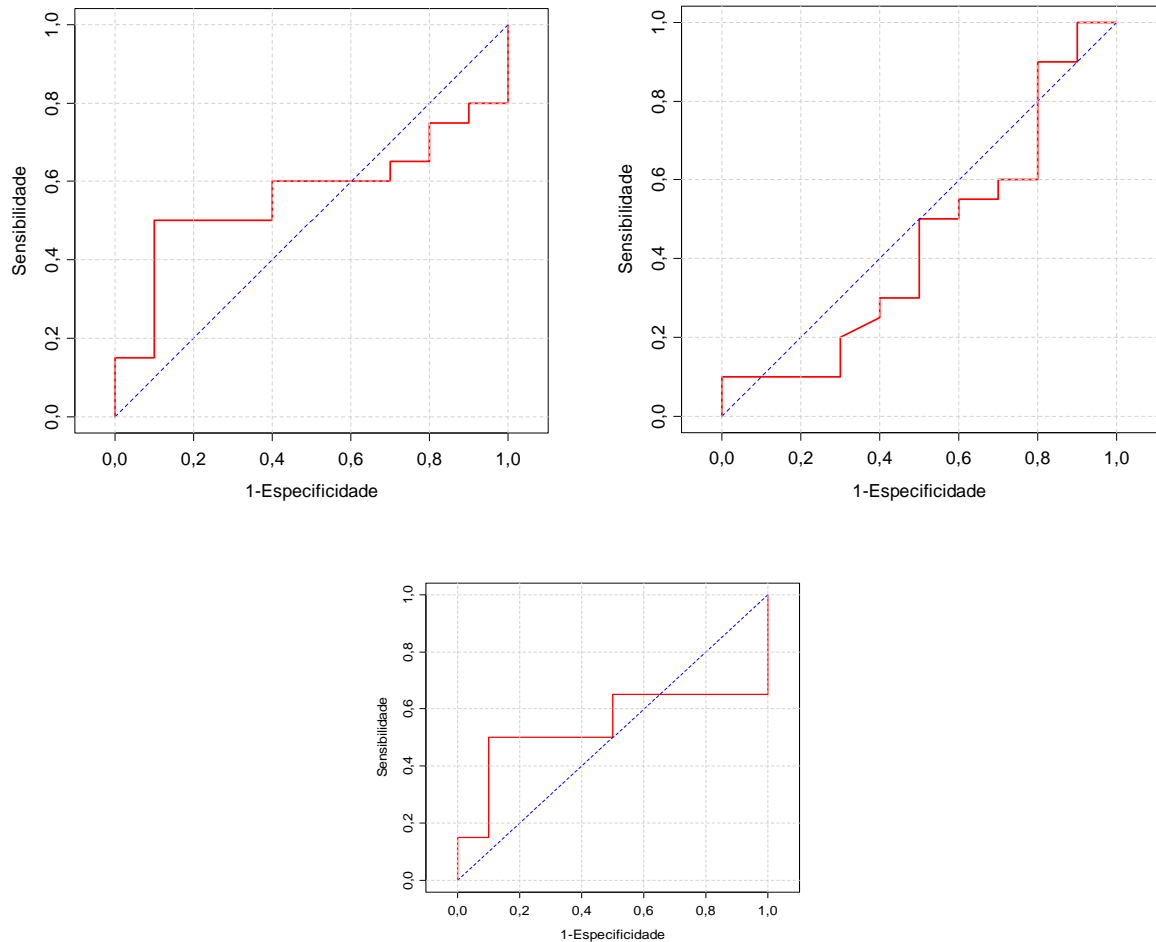


GRÁFICO 4: Curvas ROC: Curva 1 (esquerda)- nível sérico de AH e avaliação da intensidade da fibrose por RM - Área= 0,5650; $IC_{(95\%)}$ = (0,35434 ; 0,77566); $p = 0,567$; Curva 2 (direita) - nível sérico de TGF- β 1 na avaliação da intensidade da fibrose por RM Área: 0,4375; $IC_{(95\%)}$ = (0,2074; 0,6676); $p=0,58237$; curva 3 (abaixo) – nível sérico de YKL 40 e avaliação da intensidade da fibrose por RM Área = 0,54 ; $IC_{(95\%)}$ = (0,3264 ; 0,7535); $p = 0,725$

5.8 Análise da concordância entre os três métodos (ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática) no diagnóstico da fibrose hepática.

Utilizando-se a classificação da fibrose em ausente, leve, moderada e intensa a concordância revelou-se leve entre os três métodos: Kappa=0,3826; $p < 0,0001$. Utilizando-se a classificação ausente/leve versus moderada/intensa a concordância foi grande: Kappa=0,6755 ($p < 0,0001$).

TABELA 5

Resultado da avaliação da concordância entre os métodos de avaliação da intensidade da fibrose ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática

Resultado	Kappa	<i>p</i>
Ausente	-0,0465	0,6705
Leve	0,4586	<0,0001
Moderada	0,3765	0,0002
Intensa	0,4198	<0,0001
Concordância geral	0,3826	<0,0001

5.9 Análise da concordância 2 a 2 entre os métodos na classificação da intensidade da fibrose em ausente/leve versus moderada/intensa nos 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

A concordância foi grande entre os métodos de avaliação da fibrose (US versus RM; US versus biópsia; RM versus biópsia).

US x RM: Kappa= 0,6842 ; $IC_{(95\%)} = (0,331 ; 1,000)$; $p = 0,0001$

US x Biópsia: Kappa= 0,6591; $IC_{(95\%)} = (0,301 ; 1,000)$; $p = 0,0002$

RM x Biópsia: Kappa= 0,6842; $IC_{(95\%)} = (0,331 ; 1,000)$; $p = 0,0001$

6 DISCUSSÃO

6.1. Ácido hialurônico, YKL40 e TGF- β 1 no diagnóstico da presença de fibrose periportal

No presente estudo, o ácido hialurônico (AH) e o YKL40 não tiveram valor no diagnóstico da fibrose hepática da esquistossomose (não separaram os hepatoesplênicos dos hepatointestinais), quando comparados aos métodos de imagem. Alguns autores estudaram os níveis séricos de AH em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica utilizando métodos de imagem para a comparação. Pascal e colaboradores (2000) e Eboumbou e colaboradores (2005) demonstraram que o AH encontrava-se elevado nas formas avançadas da doença e sugeriram que ele poderia ser bom marcador na avaliação da morbidade e no monitoramento da reversibilidade da fibrose após tratamento específico. Marinho e colaboradores (2010), estudaram 50 pacientes com fibrose hepática e 29 sem fibrose em área endêmica e demonstraram que o AH separava os pacientes com fibrose dos pacientes sem fibrose. Por outro lado, Buchard e colaboradores (1998) não confirmaram o valor do ácido hialurônico na avaliação da fibrose periportal esquistossomótica e justificaram seus achados pela subjetividade do exame ultrassonográfico.

Nossos dados são discordantes dos descritos pelos três primeiros autores citados acima. Há, entretanto, algumas diferenças na seleção dos indivíduos estudados. Os nossos pacientes com a forma hepatoesplênica chegaram ao ambulatório já tratados da esquistossomose vários anos antes da primeira consulta e em nenhum deles foi possível demonstrar doença esquistossomótica ativa. Todos os controles, por outro lado, tinham doença ativa (ovos viáveis nas fezes). A fibrose é caracterizada pela deposição de componentes da matriz extracelular, entre eles o ácido hialurônico. Ela ocorre devido à modulação imunológica e reparo tecidual frente à reação granulomatosa crônica induzida pelos ovos do *S. mansoni* nos vasos e no tecido perivascular (LENZI *et al*, 1998;1999; WYNN *et al*, 2004). O aumento da produção de ácido hialurônico parece ser causado pela indução da proliferação das células de Ito (célula estrelada) e síntese de componentes da matriz extracelular induzidos pelas

citocinas. A redução da degradação e da depuração deve-se ao dano endotelial e à capilarização dos sinusóides. Em nosso estudo, o patologista não considerou expressiva a capilarização dos sinusóides nem encontrou evidências ou vestígios de granulomas esquistossomóticos ativos. É possível, portanto, que na ausência de doença ativa o ácido hialurônico não alcance níveis séricos suficientemente elevados para separar hepatoesplênicos não infectados de hepatointestinais infectados. Dados semelhantes foram descritos por outros autores estudando a fibrose na esquistossomose japônica (CAI *et al*, 1996; MIN *et al*, 2005; ZHENG *et al*, 2003). O fato de o ácido hialurônico reduzir no soro após o tratamento eficaz reforça o nosso argumento (EBOUMBOU *et al* 2005).

Com relação ao YKL-40, vários estudos sugeriam sua importância na avaliação da fibrose hepática e doenças inflamatórias que envolvem remodelamento tecidual (BOJESSEN *et al*, 2011). Outros autores destacavam o seu valor no diagnóstico e seguimento da evolução da fibrose em pacientes com hepatite pelo vírus C, ou na associação da hepatite C com a esquistossomose mansônica (CURRY & AFDHAL, 2005; KAMAL *et al*, 2006). Na esquistossomose japônica, Min e colaboradores (2005) mostraram ser o YKL40 mais sensível do que o AH na avaliação da intensidade da fibrose hepática. Neste último estudo, os pacientes com esquistossomose foram comparados com controles saudáveis. Colorações para fibrose hepática utilizando imunohistoquímica demonstraram a presença do YKL-40 em áreas com fibrogênese ativa (CURRY & AFDHAL, 2005). A ausência de atividade fibrogênica na biópsia dos nossos pacientes poderia justificar a falta de associação do YKL40 com a presença de fibrose hepática.

O fato de o ácido hialurônico e de o YKL40 não marcarem a fibrose nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica no presente estudo pode ter interesse clínico, se for verdade a nossa explicação para o fato, ou seja, a ausência de sinais de fibrogênese nos hepatoesplênicos curados. Nos próximos estudos os autores devem ficar atentos, quando encontrarem pacientes com fibrose revelada pelos métodos de imagem e com baixos níveis de ácido hialurônico ou YKL40, pois essa combinação poderia indicar a ausência de doença ativa (curados) e fibrose hepática em processo de regressão.

Os níveis séricos de TGF- β 1, em nosso estudo, encontravam-se significativamente mais elevados no soro dos pacientes com esquistossomose hepatointestinal do que no soro dos pacientes com a forma hepatoesplênica. Este achado nos surpreendeu. Parecia que o TGF- β 1 marcava melhor o processo inflamatório do que a fibrose hepática. Em estudo recente, Otoni (2011) mostrou aumento dos níveis séricos de MIP-1 α em pacientes com esquistossomose hepatointestinal quando comparado com controles e a explicação foi semelhante, ou seja, a presença de esquistossomose ativa aumentaria os níveis dessas quimiocinas. Outros estudos em indivíduos com hepatite viral C demonstraram que os níveis de TGF- β 1 caem em resposta à redução da atividade inflamatória em indivíduos em tratamento com interferon mesmo na ausência de alterações na fibrose hepática (CURRY & AFDHAL, 2007). No estudo de Oliveira e colaboradores (2006) avaliaram-se as citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 que foram correlacionadas com a classificação da intensidade da fibrose à ultrassonografia. Nesse estudo o TGF- β também apresentou associação negativa com a intensidade da fibrose. Assim, o TGF- β 1 poderia ser usado na avaliação da presença de atividade inflamatória e indiretamente na presença de infecção ativa pelo *Schistosoma mansoni*. O tratamento esquistossomicida eficaz poderia reduzir ou normalizar os níveis séricos de TGF- β 1 (à semelhança do que ocorre na hepatite C tratada com interferon) e em alguns casos ajudar a definir a presença ou ausência de doença ativa.

6.2. Ácido hialurônico, YKL40 e TGF- β 1 na avaliação da intensidade da fibrose classificada pela biópsia hepática e pelos métodos de imagem.

Não houve concordância entre a classificação subjetiva feita pelo patologista, quanto à intensidade da fibrose, com os marcadores séricos avaliados (AH, YKL40 e TGF- β 1). Quando se utilizou a histomorfometria houve correlação moderada entre os valores séricos do ácido hialurônico com a intensidade da fibrose hepática ($\rho=0,485$; $p=0,006$). Em estudo anterior de Voieta e colaboradores (2010), os autores não encontraram boa correlação entre os dois exames, porém os estudos não são comparáveis devido à troca do equipamento e do *software* utilizado para a análise da fibrose hepática corada pelo picrosírius vermelho. O novo *software* usado no presente estudo é superior ao usado no estudo anterior. Pelos nossos

achados a histomorfometria revelou-se superior ao exame subjetivo na classificação da fibrose hepática em relação ao ácido hialurônico. Não há na literatura estudo que tenha avaliado a fibrose hepática esquistossomótica por histomorfometria utilizando a mesma metodologia. Este achado deve ser confirmado por outros autores.

Não houve concordância entre a classificação da fibrose pelos métodos de imagem (ultrassonografia e ressonância magnética), quanto à intensidade da fibrose, com os marcadores séricos avaliados (AH, YKL40 e TGF-B1). Outros autores descreveram a correlação entre a intensidade da fibrose e os níveis séricos de ácido hialurônico (EBOUMBOU *et al*, 2005; KÖPKE-AGUIAR, 2002; MARINHO *et al*., 2010; RICHARD-BLUM *et al*, 1999). Discute-se novamente a diferença na seleção dos indivíduos estudados. No presente estudo os pacientes apresentavam hipertensão porta esquistossomótica e comprovadamente não apresentavam doença ativa. Os estudos acima foram realizados no campo em um grupo de pacientes com características clínicas mais heterogêneas.

6.3. Análise da concordância entre os três métodos (ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia hepática) no diagnóstico da fibrose hepática.

Utilizando-se a classificação da fibrose em ausente, leve, moderada e intensa a concordância revelou-se baixa entre os três métodos: Kappa=0,3826; $p < 0,0001$. Utilizando-se a classificação ausente/leve versus moderada/intensa a concordância foi grande: Kappa=0,6755 ($p < 0,0001$). Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo, resultado semelhante foi encontrado (VOIETA *et al*, 2010).

6.4. Análise da concordância 2 a 2 entre os métodos na classificação da intensidade da fibrose em ausente/leve versus moderada/intensa nos 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

A concordância foi grande entre os métodos de avaliação da fibrose (US versus RM; US versus biópsia; RM versus biópsia). Este achado demonstra que o problema não está relacionado a esses métodos e sim aos marcadores séricos de fibrose (AH e YKL40) nos pacientes com as características encontradas em nosso estudo.

6.5. A biópsia hepática como padrão ouro

Há vários anos se discute se a biópsia hepática deve ser considerada como "padrão ouro" no diagnóstico das doenças hepáticas difusas. As limitações da biópsia são: 1) fragmentos pequenos em relação ao tamanho do órgão; 2) biópsias fragmentadas que impedem a obtenção de número significativo de espaços porta para permitir diagnóstico correto; 3) a intensidade da fibrose não é homogênea, ou seja, locais com fibrose intensa se alternam com locais de fibrose leve ou moderada. A biópsia cirúrgica, que permitiria analisar fragmentos de maior tamanho (como realizado em o nosso estudo) é criticada porque analisa apenas a borda do órgão e nestes casos não reflete o acometimento mais profundo do fígado. Alguns autores sugerem que o mais correto seria dizer que a biópsia hepática é o "melhor método possível", mas não o "padrão ouro".

Nos pacientes com hepatite pelo vírus C, em que a biópsia tem papel decisivo na definição do tratamento e no acompanhamento da reversão da fibrose, os autores observaram que os marcadores séricos de fibrose não têm sido considerados satisfatórios porque o erro está em se considerar a biópsia hepática como padrão ouro. Os autores acreditam que no futuro outros métodos (como a elastografia pela ressonância magnética ou ultrassonografia) poderão substituir a biópsia como padrão ouro na lesão hepática.

Em estudo recente sobre a biópsia hepática na hepatite por vírus C, demonstrou-se que a biópsia por agulha guiada pelo ultrassom não foi capaz de recuperar fragmentos de tamanho suficiente para análise pelo patologista em 33% dos casos (AFDHAL *et al*, 2004).

6.6. Comentários derivados do estudo

Enfim, o que questionamos no presente estudo é se a classificação da fibrose hepática na esquistossomose hepatoesplênica em leve, moderada e intensa teria importância clínica, como acontece, por exemplo, na hepatite pelo vírus C. Nós encontramos pacientes com fibrose leve e grave hipertensão portal. A reversão da fibrose não parece na esquistossomose ser bom marcador de reversão da gravidade da hipertensão porta. Alguns autores assumem que as alterações vasculares encontram-se dissociadas da intensidade da fibrose (ANDRADE 2009; VOIETA *et al*, 2010). O que garante a gravidade da doença, na verdade, é a presença de hipertensão porta (VOIETA *et al*, 2010) já que a doença não evolui para a insuficiência hepática. Assim não se justificaria do ponto de vista clínico, a classificação em padrões ou graus de intensidade da fibrose. Interessa saber, apenas, se há ou não fibrose periportal por qualquer método de avaliação utilizado, o que caracterizaria o diagnóstico de provável esquistossomose hepática. Na presença de hipertensão porta (calibre dos vasos, varizes do esôfago, esplenomegalia, por exemplo), definir-se-ia então a presença de esquistossomose hepatoesplênica.

Torna-se necessário, entretanto, prosseguir no estudo dos marcadores séricos a serem utilizados, bem como na aplicação de novas tecnologias: estudo de imagem como a elastografia hepática utilizando-se a ultrassonografia e/ou a ressonância magnética, por exemplo, (CASTERA *et al*, 2008). Novos estudos devem também ter como foco a identificação do melhor marcador de doença ativa e da presença ou ausência de fibrose periportal.

7 CONCLUSÕES

1. O ácido hialurônico (AH) e o YKL40 não tiveram valor no diagnóstico da fibrose hepática da esquistossomose (não separaram os hepatoesplênicos dos hepatointestinais), quando comparados aos métodos de imagem, provavelmente porque os pacientes com esquistossomose hepatoesplênica não tinham evidência de infecção ativa pelo *S. mansoni*.
2. O TGF- β 1 não teve importância como marcador de fibrose hepática nos hepatoesplênicos, mas apresentou níveis séricos significativamente mais elevados no soro dos pacientes com esquistossomose hepatointestinal. Isso sugere que ele seja marcador de infecção ativa pelo *S. mansoni*. Ele teria mais importância como marcador da inflamação do que da fibrose hepática.
3. Não houve concordância entre a classificação subjetiva feita pelo patologista, quanto à intensidade da fibrose, com os marcadores séricos avaliados (AH, YKL40 e TGF-B1). Quanto à histomorfometria houve correlação moderada entre os valores séricos do ácido hialurônico com a intensidade da fibrose hepática.
4. Não houve concordância entre a classificação da fibrose pelos métodos de imagem (ultrassonografia e ressonância magnética), quanto à intensidade da fibrose, com os marcadores séricos avaliados (AH, YKL40 e TGF-B1).

8 PROPOSIÇÕES

Acompanhar os níveis séricos de AH e YKL40 em pacientes com a forma hepatoesplênica ativa (ovos viáveis nas fezes) antes e após o tratamento com o objetivo de confirmar os achados do presente estudo;

Analisar o TGF- β 1 em pacientes com a forma hepatointestinal da doença e comparar esses níveis antes e após o tratamento a fim de se confirmar sua relação com a atividade inflamatória em pacientes com esquistossomose mansônica.

Avaliar outras citocinas como a IL17, IL22 e IL23 como marcadores de inflamação nos pacientes com esquistossomose ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies. *Trends Parasitol*, v. 22, p. 85-91, 2006.

ABDEL-LATIF Z. *et al.* Evaluation of portal hypertension in cases of hepatosplenic schistosomiasis using ultrasound. *J Clin Ultrasound*, v.9, p.409-412, 1981.

ABDI, W; MILLAN, J.C; MEZEY, E. Sampling variability on percutaneous liver biopsy. *Arch Intern Med*, v. 139, 667-9, 1979.

AFDHAL, N. H; NUNES, D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*; Malden; v. 99, n. 6, p. 1160-74, Jun. 2004.

AFDHAL, N.H; CURRY, M. Technology evaluation: a critical step in the clinical utilization of novel diagnostic tests for liver fibrosis. *J. Hepatology*; v.46, p. 543-545, 2007.

ANDRADE, Z.A; BARKA, T. Histochemical observations on experimental schistosomiasis of mouse. *Am J Trop Med Hyg*, v. 11, p. 12-16, 1962.

ANDRADE, Z.A & WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice. Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 58:53-57, 1964.

ANDRADE, Z.A; CHEEVER, A.W. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg*, v.20, p.425-432, 1971.

ANDRADE, Z.A; GRIMAUD, J. A. Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. *Am J Pathol*, Bethesda, v. 124, p. 59-65, 1986.

ANDRADE, Z.A; GRIMAUD, J. A. Morphology of chronic collagen resorption. A study on the late stages of schistosomal granuloma involution. *Am J Pathol*, Bethesda, v. 132, n. 2, p. 389-399, Aug. 1988.

ANDRADE, Z.A; SILVA, L.M.; SOUZA, M.M. Experimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmers' fibrosis of the liver). *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v.92; n.5; p.699-706; 1997.

ANDRADE, Z. A. Schistosomal hepatopathy. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, p. 51-57, 2004. Suplemento 1.

ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Tropica*; v. 108; p. 79-82; 2008.

ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 656-663, 2009.

ANGELICO, M.; RENGANATHAN, E.; GANDIN, C.; FATHY, M.; PROFILI, M.C.; REFAI, W. et al. Chronic liver disease in Alexandria governorate; Egypt: contribution of schistosomiasis and hepatitis virus infection. *J. Hepatol*, v. 26, p. 236-243, 1997.

ARTHUR, M.J.P. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C: Editorial. *Gastroenterology*, v. 122, 1525-1528, 2002.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, v. 115, p. 209-218, 2005.

BEDOSSA, P. et al. Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 12, p. 173-178, 1988.

BEDOSSA, P; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*, v. 200, p. 504-515, 2003.

BENYON; R.C.; IREDALE; J.P. Is liver fibrosis reversible? *GUT*, v.46, p. 443-446, 2000.

BERGERS; G.; SONG S. The role of pericytes in blood-vessels formation and maintenance. *Neuro Oncol*, v. 7, p. 452-464, 2005.

BEZERRA, A.S.A.; D'IPPOLITO; G.; CALDANA; LEOPOLDINO, D.D; BATISTA, G.R; BORGES, D.R; LOPES FILHO, G.J; AHMED, M. Differentiating cirrhosis and chronic hepatosplenic Schistosomiasis using MRI. *American Roentgen Ray Society*; v.190, p. 201-207, 2008.

BEZERRA; A.S.A.; D'IPPOLITO; G.; CALDANA; R.P.; CECIN; A.O.; AHMED; M.; SZEJNFELD; J. Chronic hepatosplenic schistosomiasis mansoni: magnetic resonance imaging and magnetic resonance angiography findings. *Acta Radiol*, v.48, n.2, p.125-134, 2007.

BEZERRA; A.S.A.; D'IPPOLITO; G.; CALDANA; R.P.; CECIN; A.O.; SZEJNFELD; J. Avaliação hepática e esplênica por ressonância magnética em pacientes portadores de esquistossomose mansônica crônica. *Radiol Bras*, v.37, p.313-321, 2004.

BIEMPICA L.; TAKAHASHI; S.; BIEMPICA; S.; KOBAYASHI; M. Immunohistochemical localization of collagenase in hepatic murine schistosomiasis. *J Histochem Cytochem* v. 31; p.488-494, 1983.

BLAZEJEWSKI, S. *et al.* Human myofibroblast-like cells obtained by outgrowth are representative of the fibrogenic cells in the liver. *Hepatology*, Baltimore, v. 22, p. 788-798, 1995.

BOGLIOLO L. Quinta contribuição ao estudo da esquistossomose mansônica hepato-esplênica. Análise das teorias patogênicas da lesão hepática, com especial referência à forma de Symmers. *Hospital*; 58:271-306; 1957.

BOJESEN S.E; JOHANSEN J.S; NORDESTGAARD B.G. Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. *Clinica Chimica Acta*; 412: 709-712. Elsevier; 2011.

BRAVO A.A.; SHETH S.G.; CHOPRA S. Liver biopsy. *N Engl J Med*, v. 344, p. 495-500, 2001.

BROWN; K.E. An overview of hepatic fibrogenesis. *Rev Viral Hepatitis*.v.6, p. 5-27, 2000.

BURCHARD; 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. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-241, 1998.

CAI, W.M; SUN, Y.L; ZHANG, L.H; LIU, R.H; YU, Y.X; YANG, H.Q; ZHU, L.Z. Assay and clinical signification of 12 parameters of serum in patients with hepatic fibrosis of schistosomiasis. *Clin. J. Zoon.*, v.12, p.13-15, 1996.

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

CAPRON; A.; DESSAINT; J.P. Immunologic aspects of schistosomiasis. *Annu Rev Med*, v. 43, p. 209-218; 1992.

CASSIMAN D.; ROSKAMS T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol*, v. 37, p. 527-535, 2002.

CASTERA; L; FORNS; X; ALBERTI; A. Non invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepato*, v. 48, p. 835-847, 2008.

CELLO; J.P.; GRENDALL; J.H.; CRASS; R.A.; WEBER; T.E.; TRUNKEY; D.D. Endoscopic sclerotherapy versus portacaval shunt in patients with severe cirrhosis and acute variceal hemorrhage. *N Eng J Med*, v. 316, p.11-15, 1987.

CERRI; G.G.; ALVES; V.A.F.; MAGALHÃES; A. Hepatosplenic schistosomiasis mansoni: ultrasound manifestations. *Radiology*; v.153; p.777-780; 1984.

CHEEVER; A.W. A quantitative *pos mortem* study of schistosomiasis mansoni in man. *Am J Trop Med Hyg*; 17:38-64; 1968

DAMMEIER; J.; BRAUCHLE; M.; FALK; W.; GROTENDORST; G.R.; WERNER; S. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 30, p. 909-922, 1998.

DE JESUS; R.A.; MAGALHAES; A; MIRANDA; D.G.; MIRANDA; R.G.; ARAUJO ML; DE JESUS; A.A.; SILVA; A.; SANTANA; L.B.; PEARCE; E.; CARVALHO; E.M. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun*, v. 72, p. 3391-3397, 2004.

DESMET; V.J.; ROSKAMS; T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol*, v. 40, p. 860-867, 2004.

DOOLEY; S.; HAMAZAVI; J.; BREITRKOPF; K.; WIERCINSKA; E.; SAID; H.M.; LORENZEN; J.; *et al.* Smad 7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*; v. 125; p. 178-191; 2003.

DOEHRINGER- SCHWERTDFEGER, E. Sonomorfological abnormalities in Sudanese children with *Schistosoma mansoni* infection: a proposed staging-system for field diagnosis of periportal fibrosis. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 41, p. 63-69, 1989.

EBOUMBOU, C.; STEGHENS, J.P.; ABDALLAHI, S.O.M.; ADIL, M.; PIERRE, G.; VAN KAPPEL, A.; QUARASHI, A., BOUCHRA G.; REGGI, M. Circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis markers of oxidative stress and liver fibrosis in Sudanese subjects at risk of schistosomiasis and hepatitis. *Acta Tropica*, v. 94, p. 99-106, 2005.

ENGSTROM-LAURENT, A.; FELTELIUS, N.; HALLGREN, R.; WASTESON, A. Raised serum hyaluronate levels in scleroderma: an effect of growth factor induced activation of connective tissue cells? *Ann Rheum Dis*, v. 44, p. 614-620, 1985.

FARAH, I.O.; MOLA, P.W.; KARIUKI, T.M.; NYINDO, M.; BLANTON, R.E; KING, C.L. Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of TGF-beta and IL-4. *J. Immunol*; v.164; p.5337-5343, 2000.

FATAAR S.; BASSIONY H.;SATYANATH S.; VASSILEVA J.; HANNA R.M. Characteristic sonographic features of schistosomal periportal fibrosis. *Am J Roentgenol*, v.143, p. 69-71, 1984.

FATAAR; S.; BASSIONY; H.; SATYANATH; S.; RUDWAN; M.A.; KHAFFAJI; S.; EL MAGDY; W.; AL-ANSARI; A.G.; HANNA; R. CT of hepatic schistosomiasis mansoni. *Am J Roentgenol*, v.145, p.63-66, 1985.

FORNS; X; AMPURDANÈS; S.; LLOVET; J.M.; APONTE; J.; QUINTÓ; L.; MARTÍNEZ-BAUER; E.; BRUGUERA; M.; SÁNCHEZ-TAPIAS; J.M.; PODÉS; J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, v. 36, p. 986-992, 2002.

FRANKE; D.; KAISER C.; ELSHEIKH M.; ABDALLA S.; SCHAFER P.; EHRICH J.H.H. Ultrasonographic investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: reversibility of morbidity seven months after treatment with praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, p. 444-45, 1991.

FRASER; J. R. E. *et al.* Hyaluronan its nature; distribution; functions and turnover. *J. Int. Med.*, Oxford, v. 242, p. 27-33, 1997.

FREEDMAN, D.O.; OTTESEN, E.A. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation in vitro. *J Infect Dis*, v. 158, p. 556-562, 1988.

FRIEDMAN, S. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: The cellular basis of hepatic fibrosis - mechanisms and treatment strategies. *N. Eng. J. Med.*, Boston, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, 1993.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

FRIEDMAN; S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol*, v. 38, p.38-53, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic Stellate cells: protean multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Re*, v. 88, p. 125-172, 2008.

GALAMBOS, J. T.; SHAPIRA, R. Natural history of alcoholic hepatitis. IV. Glicosaminoglycurans and collagen in the hepatic connective tissue. *J. Clin. Invest., Ann Arbor*, v. 52, p. 2952-2962, 1973.

GARRIDO, M.C.; HUBSCHER, S.G. Accuracy of staging in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol*, v. 49, p.556-9, 1996.

GERDIN; B.; HÄLLGREN; R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J. Int. Med.*, Oxford, v. 242, p. 49-55, 1997.

GERSPACHER-LARA; R.; PINTO-SILVA; R.A.; SERUFO; J.C.; RAYES; A.A.M.; DRUMMOND; S.C.; LAMBERTUCCI; J.R. Splenic palpation for the evaluation of morbidity due to schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, p.67-71, 1998.

GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, Nova York, v. 10, n. 1, p. 30-46. 1990.

GRESSNER, A. M. The cell biology of liver fibrosis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell. Tissue Res.*, Berlim, v. 292, p. 447-452, 1998.

GRESSNER, O. V.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunctiontests. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdã, v. 381, p. 107-113, 2007.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J. Gastrointestin. Liver Dis.*, Cluj-Napoca, v.15, p. 149-159, 2006.

GRIMAUD; J. A. *et al.* Collagen isotypes; laminin; and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg*; Baltimore, v. 37, p. 335-344, 1987.

GRYSSELS; B. *et al.* Human schistosomiasis. *Lancet*; Boston, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

GUÉCHOT, J; RENÉE, E; POUPON; POUPON, R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis. *Journal of hepatology*, v.22, p. 103-106, 1995.

HAMMERMAN; A. M.; KOTNER; L. M.; DOYLE T. B. Periportal contrast enhancement on CT scans of the liver. *Am. J. Roentgenol.*; Springfield, v. 156, p. 313-315, 1991.

HASSANEIN; H. I. *et al.* Effect of early treatment with praziquantel on serum connective tissue metabolite markers in children and adolescents with intestinal schistosomiasis mansoni. *Arzneimittelforschung*; Aulendorf; v. 47, n. 1, p. 84-87, Jan. 1997.

HESSE, M.C.A.; PICCIRILLO, Y.; BELKAID, J.; PRUFER, M.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, A.W.; CHEEVER, E.M.; SHEVACH; WYNN, T.A.. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate co factor and regulatory T cells. *J. Immunol*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

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

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

HORBINSKI, C.; WANG, G.; WILEY, C.A. YKL-40 is directly produced by tumor cells and is inversely linked to EGFR in glioblastomas. *Int J Clin Exp Pathol*, v.(3)3, p.226-237, 2010.

IMBERT-BISMUT, F.; RATZIU, V.; PIERONI. L.; CHARLOTTE, F.; BENHAMOU, Y.; POYNARD, T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 357, p. 1069-1075. Multiviric group 2001.

JOHANSEN, J.S.; CHRISTOFFERSEN, P.; MOLLER, S.; *et al.* Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol*, 32, p. 911-20, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, Springer Netherlands, v.11, n.4: p. 447-455, July, 1979.

KAMAL, SM; RASENACK JW; BIANCHI L; AL TAWIL A; KHALIFA K; PETER T; MANSOUR H, et al. Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4 (+) T-cell and cytokine response. *Gastroenterology* 121, p.646-656, 2001.

KAMAL, SM; GRAHAM CS; BIANCHI L; HE Q; TAWIL AA; RASENACK JW, et al. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *J Infect Dis* 189, p.1140-1150, 2004.

KAMAL, S.M; TURNER, B.; HE, Q.; RASENACK, J.; BIANCHI, L.; TAWIL, A.A.; NOOMAN, AHMED; MASSOUD, M; KOZIEL, M.J; AFDHAL, N.H. Progression of fibrosis in Hepatitis C with and without Schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology*, v.43, p.771-779, 2006.

KANZLER, S.; BAUMANN, M; SCHIRMACHER, P.; DRIES, V.; BAYER, E.; GERKEN, G; DIENES, H.P.; LOHSE, A.W. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor- β . *Journal of viral hepatitis*, v.8, p.430-437, 2001.

KAVIRATNE, M; HESSE, M.; LEUSINK, A.W.; CHEEVER, S.J.; DAVIES, J.H.; MCKERROW, L.M.; WAKEFIELD, J.J.; LETTERIO; WYNN, T.A. IL 13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* 173, p.4020-4029, 2004.

KELLEHER, T.; MEHTA, S.; BHASKAR, R.; et al. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers. The SHATSA index. *J Hepatol*, v. 43 (1); p. 78-84; 2005.

KELLEHER, T.B.; AFDHAL, N. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Clinics in Liver Disease*, v.9, p. 667-683, 2005.

KEPHART; G.M.; ANDRADE; Z.A.;GLEISCH; G.J. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am J Pathol*, v.133, p. 388-396, 1988.

KING, C.H; MAGAK, P.; ABDEL-SALAM, E.; OUMA, J.H.; KARIUKI, H.C.; BLANTON, R.E. Measuring morbidity in schistosomiasis mansoni: relationship between image pattern, portal vein diameter and portal branch thickness in large-scale surveys using new WHO coding guidelines for ultrasound in schistosomiasis. *Tropical Medicine and International Health*, v.8, p.109-117, 2003.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 22, p. S73-S78, Suplemento 1.2007.

KITANI AI; FUSS K; NAKAMURA K; FUMAKI F; USUI T; STROBER W. Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. *J. Exp. Med* 198, 1179-1188, 2003.

KÖPKE-AGUIAR; L. A. et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis. *Acta Trop.*; Basilléia, v. 84, n. 2, p.117-126, 2002.

LAI W.K.; ADAMS D.H.; Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *J Hepatol*, v. 42, p. 7-11, 2005.

LAMBERTUCCI; J.R.; GERSPACHER-LARA; R.; PINTO-SILVA; R.A.; BARBOSA; M.M.; TEIXEIRA; R.; BARBOSA; H.F.; SERUFO; J.C.; REZENDE; D.F.; DRUMMOND; S.C.; RAYES; A.A.M. O projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais; Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*; v.29, p.127-135, 1996.

LAMBERTUCCI; J.R.; COTA; G.F.; PINTO-SILVA; R.A.; SERUFO; J.C.; GERSPACHER-LARA; R.; DRUMMOND; S.C.; ANTUNES; C.M.; NOBRE; V.; RAYES; A.A.M. Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, p.147-150, 2001.

LAMBERTUCCI, J.R.; ANDRADE, L.M.; PINTO-SILVA, R.A. Magnetic resonance imaging of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.35, p.679-680, 2002.

LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, L.C.S.; ANDRADE, L.M.; QUEIROZ, L.C.; PINTO-SILVA, R.A. Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.37, p. p.333-337, 2004.

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. magnetic resonance. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.40, n.5, p.599, set-out, 2007.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Haluronan. *FASEB J.*, Bethesda, v. 6, p. 2397-2404, 1992.

LAURENT, U.B.G; LAURENT, T.C. On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem Int*; v.2, p. 195-199, 1981.

LEE; J.S.; SEMELA; D.; IREDALE J.; SHAH V.H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function of the liver-specific pericyte? *Hepatology*, v. 45, p. 817-825, 2007.

LENZI; H. L. *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, p. 141-151, 1998. Suplemento 1.

LENZI; H. L.; SOBRAL A.C.; LENZI; J.A. Participation of endothelial cells in murine schistosomiasis. *Brz J Med Biol Res*; v. 21, p. 999-1003, 1999.

LI G; XIE Q; SHI Y; LI D; SHANG M; JIANG S, et al. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* v. 8, p. 889-900, 2006.

LICHTINGHAGEN, R; BAHR, M.J. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. *Expert Review of molecular diagnostics*, v.4, p. 715-726, 2004.

LOEFFLER; D.A.; LUNDY; S.K.; SINGH; K.P.; GERARD; H.C.; HUDSON; A.P.; BOROS; D.L. Soluble egg antigens from *Schistosoma Mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Infect Dis*, v. 185, p. 1650-1656, 2002.

MAHARAJ B.; LEARY W.P.; NARAN A.D. *et al.* Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet*; v.1, p.523-525, 1986.

MAHMOUD; A.A.F.; WARREN; K.S.; GRAHAM; R;C. Antieosinophil serum and the kinetics of eosinophilia in *Schistosomiasis mansoni*. *J Exper Med*, v. 142, p. 560-573, 1975.

MANZELLA, A. *et al.* Schistosomiasis of the liver. *Abdom. Imaging*, Nova York, v. 33, p. 144-150, 2007.

MARINHO; C.C.; BRETAS T.; VOIETA I.; QUEIROZ L.C.; RUIZ-GUEVARA R.; TEIXEIRA; A.L.; ANTUNES; C.M.; PRATA A.; LAMBERTUCCI; J.R. 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*, v. 105, p. 471-478, 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. *Anal. Biochem.*, Nova York, v. 319, p. 65-72, 2003.

McHUTCHISON, J. G. *et al.* Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 15, p. 945-951, 2000.

MEDINA; J; SANZ-CAMENO; P.; GARCÍA-BUEY;L.; MARTIN-VILCHEZ; S.; LÓPEZ-CABRERA; M.; MORENO-OTERO; R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol*, v. 42, p.124-131, 2005.

MEDRADO; A.P.; SOARES; A.P.; SANTOS; E.T.; REIS; S.R.; ANDRADE; Z.A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photoch em Photobiol*, B 92, p. 144-152, 2008.

MIN, Z; WEI-MIN, C; JUN-KANG, Z; SHAO-MING, Z; RONG-HUA, L. Determination of serum levels of YKL40 and hyaluronic acid in patients with hepatic fibrosis due to schistosomiasis japonica and appraisal of their clinical value. *Acta Tropica*, v.96, p.148-152, 2005.

MOHAMADZADEH, M. *et al.* Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 101, n. 1, p. 97-108, Jan. 1998.

MORAIS, C.N.L; CARVALHO, B.M; MELO, W.G; MELO, F.L; LOPES, E.P.A; DOMINGUES, A.L.C; JUCÁ, N; MARTINS, J.R.M; DINIZ, G.T.N; MONTENEGRO, S.M.L. Correlation of biological serum marker with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.105(4) ,p.460-466, 2010.

MYERS, R.P.; RATZIU, V.; IMBERT-BISMUT, F.; CHARLOTTE, F.; POYNARD, T. Multiviric group. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with histological features in patients with chronic hepatitis. *C. Am J Gastreenterol*, v.97, p. 2419-2425, 2002.

NAKATSUCASA, H. *et al.* Cellular distribution of transforming growth factor- β_1 and procollagen types I, III and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 85, p. 1833-1843, 1990.

NIAMEY WORKING GROUP. Ultrasound in schistosomiasis. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity. UNDP/World Bank/WHO/Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization/TDR/SCH/ULTRASON document. Geneva; Switzerland; 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/ultrasound.pdf>> Acesso em: 9/4/2010

NINOMIYA T; YOON S; HAYASHI Y; *et al.* Clinical significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha: histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. *J Gastroenterol Hepatol*, 13, p. 68-74, 1998.

O'BRIEN; M.J.; KEATING; N.M.; ELDERINY; S.; *et al.* An assessment of digital image analysis to measure fibrosis in liver biopsy specimens of patients with chronic hepatitis, C. *Am J Clin Pathol*; v. 114, p. 712-8; 2000.

OBEN; J.A.; DIEHL A.M. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *Anat Rec*, v. 280A, p. 874-883, 2004.

OLIVEIRA, L.F.A; MORENO, E.C; GAZINELLI, G; MARTINS-FILHO, O.A; SILVEIRA, M.M.S; GAZINELLI, A; MALAQUIAS, L.C.C; LOVERDE, P; MARTINS LEITE, P; CORREA-OLIVEIRA, R. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis Mansoni in Humans. *Infection and Immunity*, v.74, p.1215-1221, 2006.

OROZCO; H.; MERCADO; M.A.; CHAN; C.; NAVARRO; E.G.; MARTINEZ; L.M.L. A comparative study of the elective treatment of variceal hemorrhage with beta-blockers; transcendoscopic sclerotherapy and surgery. *Ann Surg*; v.232, p.216-219, 2000.

OTONI A. Tese de doutorado 2011 - UFMG. O perfil de quimiocinas na urina e no soro de pacientes com a glomerulopatia da esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

PARADIS V; DARGERÉ D; BONVOUST F; VIDAUD M; SERGARINI P; BEDOSSA P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab invest*, 82, p.767-774, 2002.

PASCAL, M. *et al.* Hyaluronate levels and markers of oxidative stress in the serum of Sudanese subjects at risk of infection with *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 94, n. 1, p. 66-70, 2000.

PATEL, A.S.; CASTILLO, D.F.; HIBBELN, J.F.; WATKINS, J.L. Magnetic resonance imaging appearance of hepatic schistosomiasis, with ultrasound and computed tomography correlation. *Am J Gastroenterol*, v.88, p.113-116, 1993.

PEARCE; E. J. *et al.* Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v. 201; p. 117-126, 2006.

PELLEY; R.P.; PELLEY R.J.; HAMBURGER; J.; PETERS; P.A.;WARREN; K.S. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens: I. Identification and purification of three major antigens; and the employment of radioimmunoassay for their further characterization. *J Immunol*, v. 117, p.1553-1560, 1976.

PETROIANU; A. Tratamento cirúrgico da hipertensão porta da esquistossomose mansoni. *Rev Soc BrasMed Trop*, v.36; n.2, p.253-265, mar/abr, 2003.

PILETTE; C.; ROUSSELET; M.C.; BEDOSSA; P. *et al.* Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semiquantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol*, v. 28, 439-46, 1998.

PINTO-SILVA; R.A.; ABRANTES; W.L.; ANTUNES; C.M.; LAMBERTUCCI; J.R. Sonographic features of portal hypertension in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop; São Paulo*, v.36, p.355-361, 1994.

PINTO-SILVA; R.A.; QUEIROZ; L.C; AZEREDO; L.M; SILVA; L.C; LAMBERTUCCI; J.R. Ultrasound in schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; Jul;105(4):479-84. Review, 2010.

PLEVRIS, J.N; HAYDON, G.H; SIMPSON, K.J; DAWKES, R; LUDLUM, C.A; HARRISON, D.J; HAYES, P.C. Serum hyaluronan – a non invasive test for diagnosing liver cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v.10, p. 1121-7, 2000.

POYNARD, T; IMBERT-BISMUT, F; RATZIU, V; CHEVRET, S; JARDEL, C; MOUSSALLI J; MESSOUS D; DEGOS F; GERMED cyt04 group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* v.9, p.128-133, 2002.

POYNARD, T; MUNTEANU, M; IMBERT-BISMUT, F; CHARLOTTE, F; TABUT, D; LE CALVEZ S; ; MESSOUS, D; THIBAU, T V; BENHAMOU, Y; MOUSSALLI, J; RATZIU V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis, *C. Clin Chem*, v. 50, p. 1344-1355, 2004.

POYNARD T, IMBERT-BISMUT F; MUNTEANU M; RATZIU V. Fibrotest – FibroSURE: towards a universal biomarker of liver fibrosis? *Expert Rev Mol Diagn*, v. 5, p. 15-21, 2005.

QI, Z. et al. Blockade of type α transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *PNAS USA*, Washington, v. 96, p. 2345-2349, 1999.

REIS; M.G.; ANDRADE; Z.A. Functional significance of periovular granuloma in schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res*, v. 20, p. 55-62, 1987.

REMOUE, F.D.; TO VAN, A.M.; SCHACHT, M.; PICQUET, O.; GARRAUD, J.; VERCRUYSSSE, A; LY, A.; CAPRON, RIVEAU G. Gender-dependent specific immune response during chronic human schistosomiasis haematobia. *Clin Exp Immunol*, v. 124, p.62-68, 2001.

RICHARD-BLUM; HARTMANN, D.J; GRENARD, P; RAVAOALIMALALA, V.E; BROISIER, P; ESTERRE, P. Relationships between several markers of extracellular matrix turn-over and ultrasonography in human schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg*, v. 60, p. 658-663, 1999.

RICHTER, J.; ZWINGENBERGER, K.; MOHAMED-ALI, Q.; LIMA, W.M.; DACAL, A.R.C.; SIQUEIRA, G.V.; DOEHRING-SCHWERDTFEGE, R.E.; FELDMIEIER, H. Hepatosplenic schistosomiasis: comparison of sonographic findings in brazilian and sudanese patients – correlation of sonographic findings with clinical symptoms. *Radiology*, v.184, p.711-716, 1992.

RICHTER, J.; DOMINGUES, A.L.C.; BARATA, C.H.; PRATA, A.R.; LAMBERTUCCI, J.R. Report on the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v.96, p.151-156; 2001.

ROSKAMS; T.; CASSIMAN; D.; VOS; R.; LIBBRECHT; L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec*, v. 280, p.910-923, 2004.

ROSMORDUC; O.; WENDUM; D.; COPRECHOT; C.; GALY B; SEBBAGH; N.; RALEIGH; J.; HOUSSET; C.; POUPON; R. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol*, v.155, p.1065-1073, 1999.

RUIZ-GUEVARA JR. *Esquistossomose na área hiperendêmica de Brejo do Espírito Santo, seguimento de 29 anos*. 2005. 239p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia) – Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba.

SAKAI; P.; MALUF; F.; GURGEL; J.; ISHIOKA; S. Late results of endoscopic sclerotherapy of bleeding esophageal varices in patients with hepatic cirrhosis and schistosomiasis. *Arq Brás Cir Dig*, v.10, p.17-21, 1995.

SANDRIN, L; FOURQUET, B; HASQUENOPH, J.M.; YON, S.; FOURNIER, C; MAL, F.; CHRISTIDIS, C.; ZIOL, M.; POULET, B.; KASEMI, F.; BEAUGRAND, M.; PALAU R. Transient elastography: a new noninvasive method of assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 29, p.1705-1713, 2003.

SANTOS; M.M.; GARCIA; T.C.; ORSINI; M.; DISCH; J.; KATZ; N.; RABELLO; A. Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.94, p.289-292, 2000.

SANTOS; V. N. *et al.* Serum laminin; type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. *Braz. J. Med. Biol. Res*, São Paulo, v. 38, p. 747-753, 2005.

SCHLICHTING; P.; FAUERHOLDT; L.; CHRISTENSEN; E; *et al.* Clinical relevance of restrictive morphological criteria for the diagnosis of cirrhosis in liver biopsies. *Liver*, v. 1, 56-61, 1981.

SILVA, L.M; FERNANDES, A.L.M; BARBOSA, A. JR; OLIVEIRA, I.R; ANDRADE, Z.A. Significance of schistosomal granuloma modulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95, p.353-361, 2000.

SILVA, L.C.; PEREIRA, A.C.F.; QUEIROZ, L.C.; ANDRADE, L.M.; ANTUNES, C.M.F.; LAMBERTUCCI, J.R. Disagreement between ultrasound and magnetic resonance imaging in the identification of schistosomal periportal fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, n.1, p.279-282, 2006.

SILVA, L.C.; ANDRADE, L.M.; QUEIROZ, L.C; VOIETA I; AZEREDO, L.M; ANTUNES, C.M.F.; LAMBERTUCCI, J.R. *Schistosoma mansoni*: magnetic resonance analysis of liver fibrosis according to WHO patterns for ultrasound assessment of schistosomiasis related morbidity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; v.105, p.467-470, 2010.

SILVA, L.C; DOMINGUES, A.L; LOPES, E.P; MORAIS, N.C; SANTOS, R.B; LUNA, C.F; NADER, H.B; MARTINS, J.R. Schistosomiasis mansoni: ultrasound-evaluated hepatic fibrosis and serum concentrations of hyaluronic acid. *Ann. Trop. Med. & Parasitology*, v.105, p.233-239, 2011.

SOUZA, M.R.A.; TOLEDO, C.F.; BORGES, D.R. Trombocytopenia as a predictor of Portal Hypertension in Schistosomiasis. *Digestive Diseases and Sciences*, v.45, n.10: p.1964-1970, October, 2000.

SOUZA; A.L.S. *et al.* The role of chemokines in *Schistosoma mansoni* infection: insights from human disease and murine models. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, Suplemento 1, p. 333-338, Rio de Janeiro, 2006.

STONE; P. J. Potential use of collagen and elastin degradation markers for monitoring liver fibrosis in schistosomiasis. *Acta Trop. Basileia*; v. 77, p. 97-99, 2000.

SYMMERS; W.S.T.C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *bilharzia hematobia*. *J Path*, v.9, p.237-239, 1904.

TORRE, F. *et al.* Peripheral blood serum markers for apoptosis and liver fibrosis: are they trustworthy indications of liver realness? *Dig. Liver Dis.*, Amsterdã, v. 40, n. 6, p. 441-445, Jun. 2008.

THABUT, D; SIMON, M.; MYERS, R.P, et al. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 37, p.1220-1, 2003.

TSUKADA, S; PARSONS, P.J; RIPPE, R.A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta*, v. 364, p. 33-60, 2006.

VIANNA, M.R.; GAYOTTO, L.C.; TELMA R; SANTOS, M.; ALVES, V.A.; FUKUSHIMA, J.; DE BRITO, T. Intrahepatic bile duct changes in human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Liver*; 9, p.100-109, 1989.

VOIETA I. Comparação entre a fibrose periportal diagnosticada pelo ultra-som e pela ressonância magnética e a histologia hepática na hipertensão portal esquistossomótica. 2007. 94F. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VOIETA I; QUEIROZ LC; ANDRADE LM; SILVA LCS; FONTES VF; BARBOSA JR A; RESENDE V; PETROIANU A; ANDRADE Z; ANTUNES CM; LAMBERTUCCI JR. Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n4. jul. 2010.

WAI, C.T.; GREENSON, J.K.; FONTANA, R.J.; KALBFLEISCH, J.D.; MARRERO JA; CONJEEVARAM; H.S.; LOK, A.S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38, p.518-526, 2003.

WEINSTOCK JV; ELLIOTT D; METWALI A; *et al.* Immunoregulation within the granulomas of murine schistosomiasis mansoni. *Microbes Infect*, v. 1, p 491-498. 1999.

WESTIN J; LAGGING LM; WEJSTAL R; *et al.* Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver*, v.19, p. 183-7, 1999.

WILLEMSSEN, U.F. *et al.* MRI of hepatic schistosomiasis mansoni. *J. Comput. Assist. Tomogr*, Nova York, v. 19, n. 5, p. 811-813, 1995.

WILLEMSSEN; U.F.; PFLUGER; T.H.; ZOLLER; W.G.; KUEFFER; G.;HAHN; K. MRI of hepatic schistosomiasis mansoni. *J Comput Assist Tomogr*, v19, p.811-813, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2008. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-schisto-mtg-07.htm>>. Acesso em: 9/4/2010

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2010. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-schisto-mtg-07.htm>>. Acesso em:

WYNN; T.A. Fibrotic disease and the T (H)1/ T(H) 2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, p. 583-594, 2004.

ZAITOUN; A.M.; AL MARDINI H.; AWAD; S.; *et al.* Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C *J Clin Pathol*, v. 54, p. 461-5, 2001.

ZHENG, M; CAI, W.M; WENG, H.L; LIU, R.H. Determination of serum fibrosis indices in patients with chronic hepatitis and its significance. *Clin. Med. J.*, v.116, p.346-349, 2003.

ZHU, H.L; ZENG, D.; ZHU, D.; YUAN, Y. The role of TGF-beta 1 in mice hepatic fibrosis by schistosomiasis japonica. *J. Tongji Med Univ.* 20, p.320-321, 329, 2000.

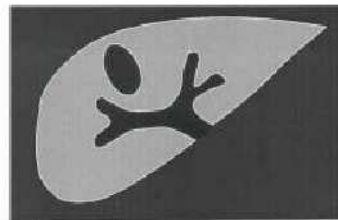
ZIOL, M; HANDRA-LUCA, A; KETTANEH, A.; CHRISTIDIS, C; MAL, F.; KASEMI, F.; DE LÉDINGHEN, V.; MARCELLIN, P.; PHUMEAUX, D.; TRINCHET, J.C.; BEAUGRAND, M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis. *C. Hepatology* 41, p.48-54,2005.

ANEXO A - Padrões ultrassonográficos de imagem hepática. Originais do Guia Prático para Avaliação Ultra-sonográfica da Morbidade pela Esquistossomose. [WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ultrasound in schistosomiasis. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity. UNDP/World Bank/WHO/Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization / TDR / STR / SCH document. Geneva, Switzerland, 2000]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/ultrasound.pdf>

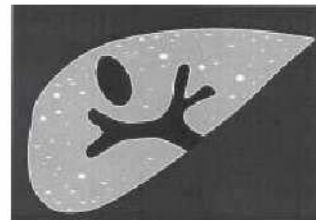
Ultrasound in Schistosomiasis
Page 45

ANNEX A: IMAGE PATTERNS IN THE LIVER PARENCHYMA, OBSERVED BY ULTRASONOGRAPHY

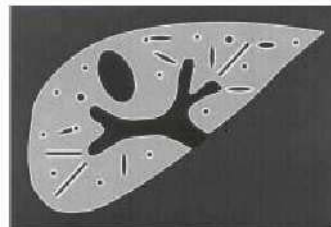
Patterns associated with schistosomiasis (A – F)



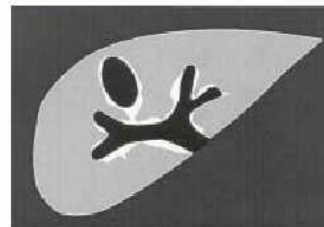
A : normal



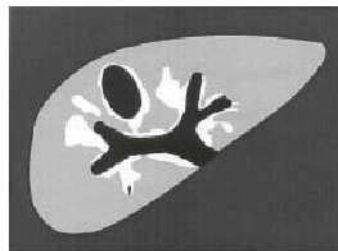
B : "starry sky"



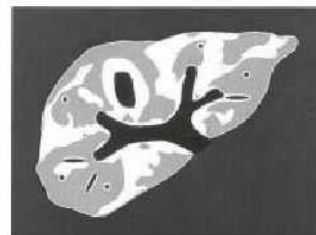
C : "rings and pipe-stems"



D : "ruff" around portal bifurcation



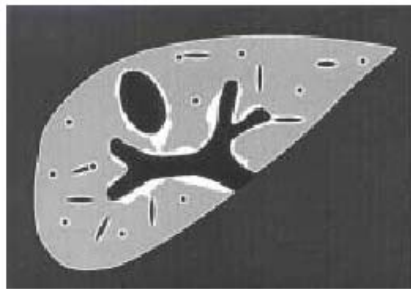
E : "patches"



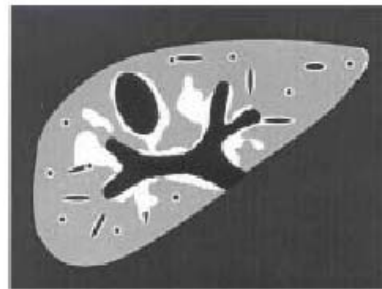
F : "bird's claw"

**ANNEX A: IMAGE PATTERNS IN THE LIVER PARENCHYMA, OBSERVED BY
ULTRASONOGRAPHY**

Combined patterns (Dc, Ec)

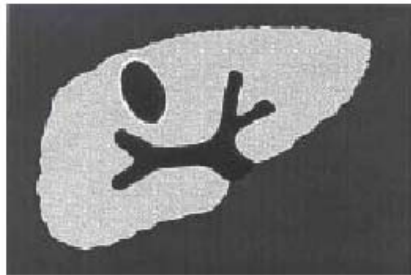


D c



E c

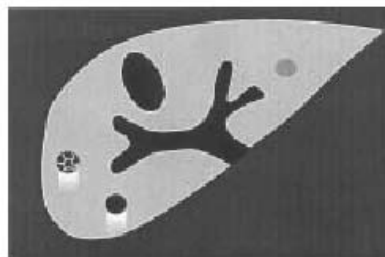
Patterns not known to be related to schistosomiasis



X : cirrhosis-like



Y : fatty liver-like



Z : other abnormalities

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa UFMG

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP**Parecer nº. ETIC 304/06****Interessado: Prof. José Roberto Lambertucci
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina-UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou *ad referendum*, no dia 31 de janeiro de 2007, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Marcadores de fibrose e inflamação em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica avançada"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Diáia Auxiliadora R. Cavallio
p/ **Profa. Dra. Maria Eiena de Lima Perez Garcia**
Presidente do COEP-UFMG

APÊNDICE A – Questionário padronizado para a coleta de dados dos 30 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica avaliados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP Orestes Diniz), no período de julho de 2006 a julho de 2010.

I) Identificação

II) Entrevista – Exposição à esquistossomose

História epidemiológica positiva sim () não () ign ()

Tem atividade de eliminação de ovos sim () não () ign ()

Já teve hemorragia digestiva: sim () não () ign ()

Número de episódios de HDA _____

Data da 1ª HDA ____ / ____ / ____ Data da última HDA ____ / ____ / ____

Cirurgia de hipertensão porta: sim () não () ign ()

Data da cirurgia: ____ / ____ / ____

Indicação da cirurgia: _____ Tipo de cirurgia: _____

Esplenectomia prévia: sim () não () ign () Data da cirurgia: ____ / ____ / ____

Tratamento prévio para xisto? sim () não () ign ()

III) Exame físico

Peso (kg) _____ Altura (cm) _____ PA (mmHg) _____ FC (bpm) _____

Fígado: palpável () não palpável () cm do AX _____

Baço: palpável () não palpável () cm do RCE na LHC _____

IV) Exames complementares

Hemograma data ____ / ____ / ____

Hm _____ Hb _____ Htc _____ VCM _____ HCM _____ CHCM _____

Plaq _____ LG _____ N _____ L _____ E _____ M _____ B _____ ASAT _____

HbsAg pos () neg () ign () data ____ / ____ / ____

anti-HBs pos () neg () ign () data ____ / ____ / ____

anti-HBc pos () neg () ign () data ____ / ____ / ____

anti-HCV pos () neg () ign () data ____ / ____ / ____

EDA (____ / ____ / ____):

Varizes esofagianas sim () não () ign ()

Varizes gástricas sim () não () ign ()

Ultra-sonografia (____ / ____ / ____)

Fígado: Dimensão longitudinal LD _____ Dimensão longitudinal LE _____

Contornos: liso () lobulado () serrilhado ()

Fibrose periportal: ausente () leve () moderada () intensa ()

Padrão de fibrose: A () B () C () D () Dc () E () Ec () F ()

Presença de colaterais >3mm? sim () não ()

Quais? _____

Baço: Diâmetro longitudinal do baço _____

RM (____ / ____ / ____)

Fígado: Dimensão LD _____ Dimensão LE _____

Contornos: liso () lobulado () serrilhado ()

Fibrose periportal: ausente () leve () moderada () intensa ()

Padrão de fibrose: A () B () C () D () Dc () E () Ec () F ()

Presença de colaterais >3mm? sim () não ()

Quais? _____

Baço: Diâmetro do baço _____

V) Estudo anatomopatológico

Data da biópsia: (____ / ____ / ____)

Descrição da lâmina: _____

Presença de fibrose: sim () não () ign ()

Fibrose periportal: ausente () leve () moderada () intensa () ign ()

Presença de granuloma: sim () não () ign ()

Evidência de ovo: sim () não () ign ()

Hiperplasia da parede arterial: sim () não () ign ()

Distorção da parede dos vasos: sim () não () ign ()

Análise quantitativa da fibrose _____

VI) Estudo de marcadores

AH _____ FGFβ-1 _____ YKL-40 _____

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Consentimento Esclarecido****Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa.****Aplicado aos pacientes do grupo de estudo – portadores de hipertensão porta de etiologia esquistossomótica e indicação de intervenção cirúrgica.**

Pesquisadora: Izabela Voieta da Silva Teixeira

Introdução: Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa denominada: “MARCADORES DE FIBROSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE HEPATOESPLÊNICA AVANÇADA”

Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: o objetivo deste estudo é correlacionar as alterações do fígado na esquistossomose (fibrose) comparando marcadores no sangue, imagens vistas nos exames de ultra-sonografia e ressonância magnética, com os achados à análise da biópsia do fígado realizada no momento da cirurgia.

Resumo: a esquistossomose (xistose) é uma doença muito freqüente no Brasil e no mundo. O *Shistosoma mansoni* é o verme causador. Ele vive dentro das veias do abdome da pessoa infectada, mas seus ovos podem ir para o fígado e produzir uma inflamação nesse órgão. Ao longo do tempo essa inflamação se transforma em fibrose – cicatriz – que pode levar ao aumento da pressão nos vasos sanguíneos da região do fígado. Esse aumento de pressão pode levar a aumento do baço, varizes de esôfago, estômago e da região final do intestino, que podem vir a sangrar. É muito importante identificar o grau de inflamação no fígado da pessoa doente para que se avaliem os riscos, a evolução da doença, o benefício do tratamento e a indicação cirúrgica para evitar sangramentos volumosos que podem levar à morte caso a assistência médica não seja adequada e em tempo hábil. Para isso, o ultra-som abdominal tem sido utilizado. Procuramos também esclarecer se o exame por ressonância magnética do abdome não é melhor em determinados casos. No sangue coletado e na biópsia (retirada de

pequeno fragmento do fígado) realizada no momento da cirurgia, esperamos encontrar também alguns marcadores que nos darão pistas sobre a presença e o grau de acometimento da doença no fígado.

Procedimentos: para que você participe do nosso estudo é preciso que tenha o diagnóstico de hipertensão porta causada pela esquistossomose, sem restrição de raça ou sexo e indicação de cirurgia. As indicações são: varizes de fundo gástrico com risco de sangramento, baço muito volumoso e com risco de ruptura, anemia incontrolável associada ou não a plaquetas muito baixas e diminuição importante das células de defesa (leucócitos). À admissão no estudo, você será submetido a: entrevista, exame físico e coleta de sangue (uma única vez, 10 mL). Depois, será submetido aos exames de imagem: ultra-som e ressonância magnética do abdome. Este exame não utiliza nenhum tipo de radioatividade e está contra-indicado em portadores de marcapasso do coração ou cliques de aneurismas cerebrais (cirurgia para aneurisma da cabeça). No momento da cirurgia do baço, será realizada biópsia do fígado (retirada de pequeno fragmento) para análise.

Riscos: a injeção de contraste na veia, indispensável para o exame de ressonância magnética, pode raramente desencadear reação alérgica, que pode vir a ser grave, mesmo em pessoas que nunca tiveram alergias antes. Caso você desenvolva qualquer efeito colateral, será tratado prontamente pela equipe do estudo, com medicamento injetável ou oral e observação clínica por um período de pelo menos seis horas. O risco da biópsia do fígado é o de sangramento que, diante do tamanho da cirurgia, é previsto pelo cirurgião. A cirurgia é realizada com a barriga aberta, o que facilita a pronta visualização e correção dos possíveis sangramentos.

Danos: no caso de você apresentar uma reação adversa durante a realização do estudo, deverá contatar imediatamente a médica responsável pelo estudo, Dra. Izabela Voieta, pelo telefone 8835-1707. Caso ela não esteja disponível, entre em contato com algum outro médico de sua equipe no Hospital das Clínicas da UFMG - tel: 3248-9820 ou 3248-9821 (sala do Prof. Lambertucci) – recados com Silvana, secretária do projeto. Caso você sofra qualquer dano físico como resultado direto de quaisquer dos procedimentos envolvidos, você receberá todos os cuidados médicos providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG. Ao participar, você concorda em cooperar com qualquer convênio médico ou seguro médico disponível a você em relação a estes cuidados médicos. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

Benefícios: não haverá benefício pessoal imediato com a sua participação na pesquisa.

Confidencialidade: os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. No entanto, o pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/ UFMG.

Desligamento: a sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem afetar seu acompanhamento médico em andamento. Seu médico poderá finalizar sua participação neste programa de pesquisa se forem identificadas outras causas de doença em seu fígado ou se o programa for cancelado por questões administrativas.

Novas descobertas: todos os novos achados descobertos durante a realização desta pesquisa que possam influenciar seu desejo em continuar a participar deste estudo serão fornecidos a você assim que tais informações se tornarem disponíveis.

Compensação: você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Contato com a Comissão de Ética: durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico relacionado à esquistossomose, contate a Dra. Izabela Voieta no telefone 8835-1707, Faculdade de Medicina 3248-9820 (laboratório – Secretária Silvana) ou o Comitê de Ética: telefone (31) 3499-4592 (endereço Av. Antonio Carlos, 6627, Unidade Administrativa 2, 2º andar, sala 2005).

Consentimento: li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

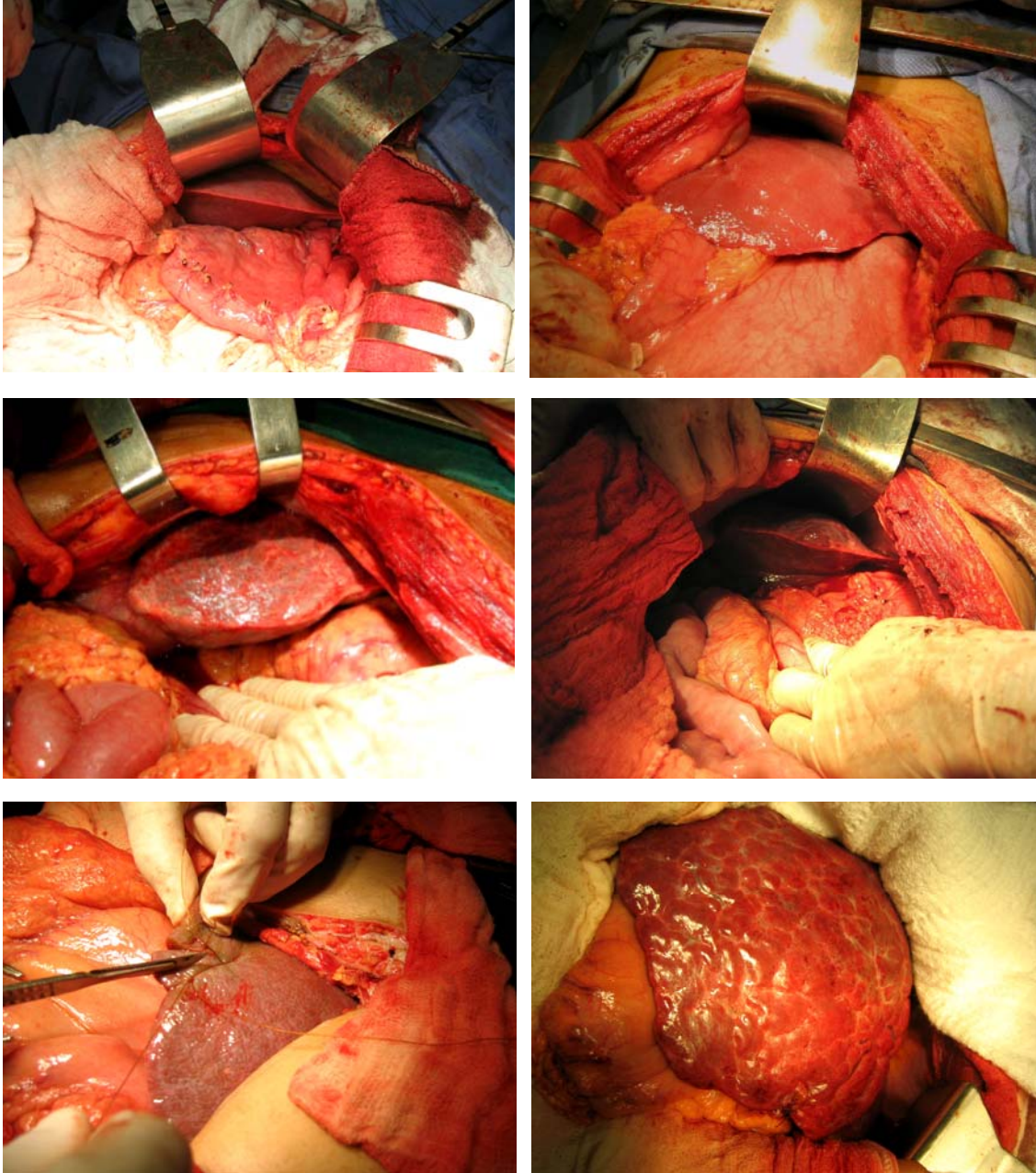
Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador.

APÊNDICE C- Aspecto macroscópico do fígado em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (VOIETA I, 2007).



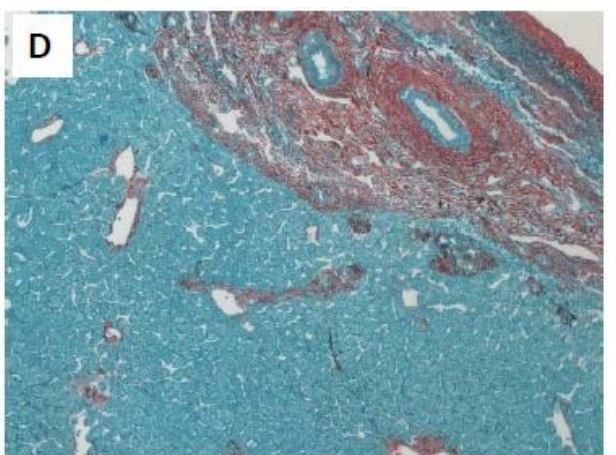
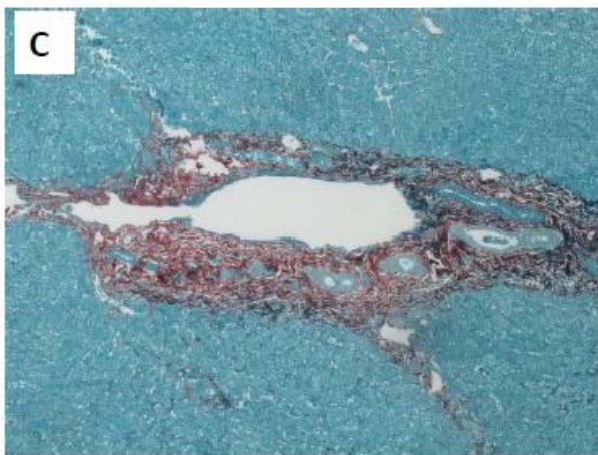
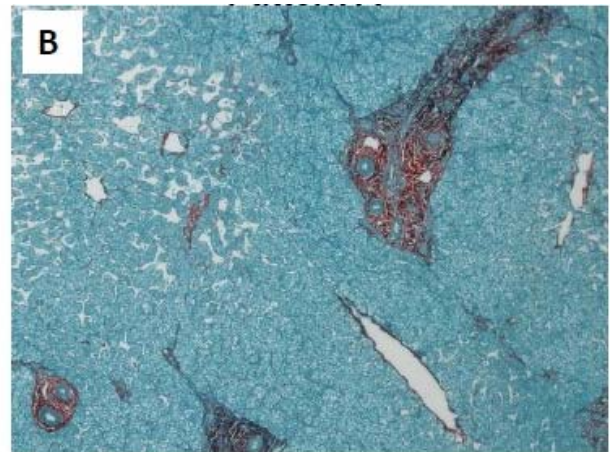
APÊNDICE D – Cortes histológicos corados com picrossirius vermelho e sua correspondente avaliação por patologista (Fonte: do autor) – Ampliação 100x

A- Fígado normal

B- Padrão C

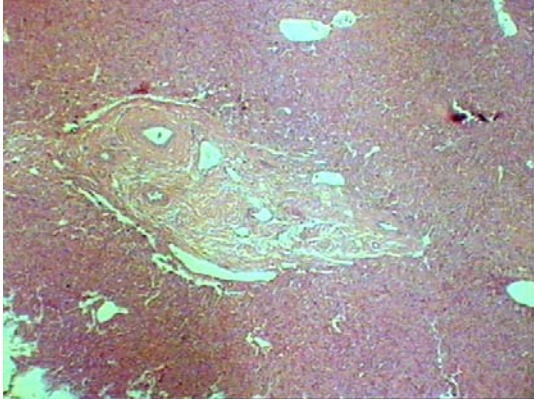
C- Padrão D-Dc

D- Padrão Ec-F

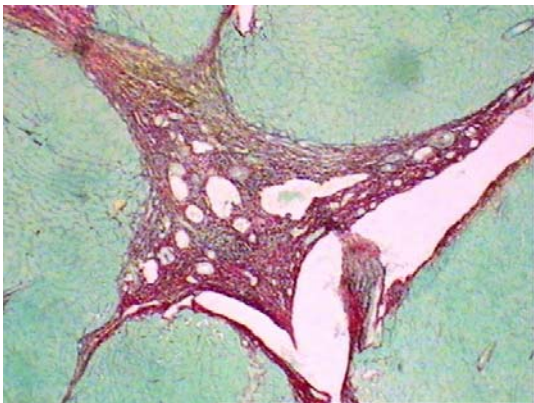


Exemplos de cortes histológicos de pacientes estudados.

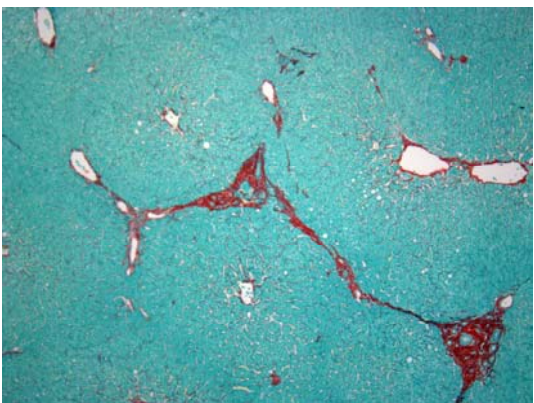
A- Lâmina corada com hematoxilina e eosina – espaço porta (100x)



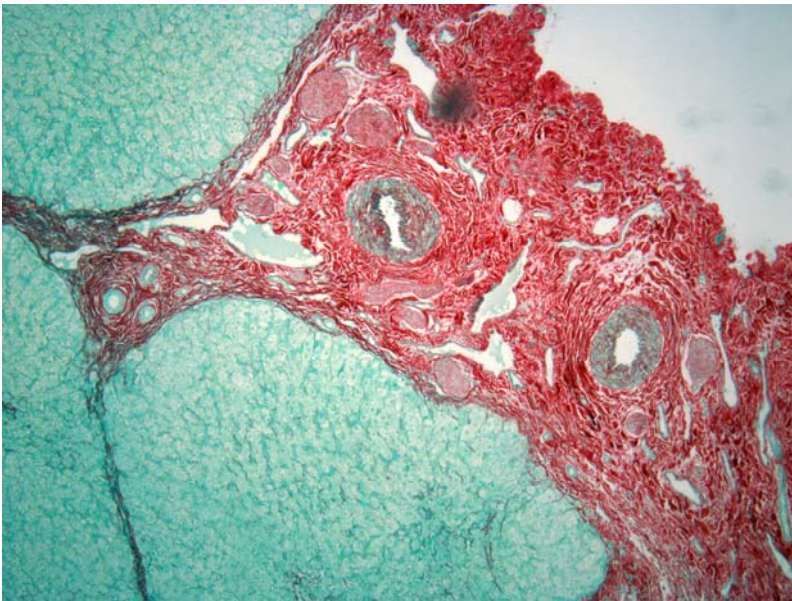
B – Lâmina corada com picrossirius – espaço porta com fibrose e parênquima preservado (100x)



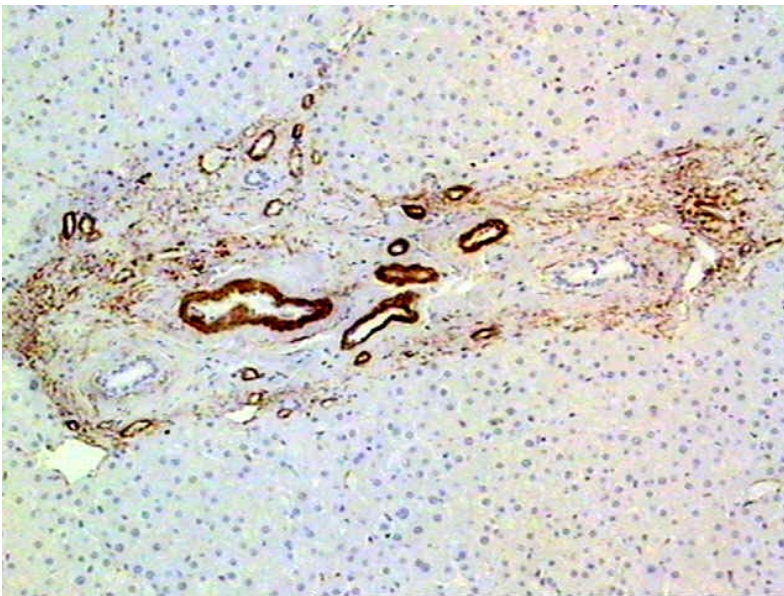
C – Lâmina corada com picrossirius – *Fibrose de Symmers* (10x)



D- Lâmina corada com picrosssirius – Fibrose periportal, hipertrofia da parede arterial (100x)



E- Lâmina marcada com actina - para endotélio vascular (10x)



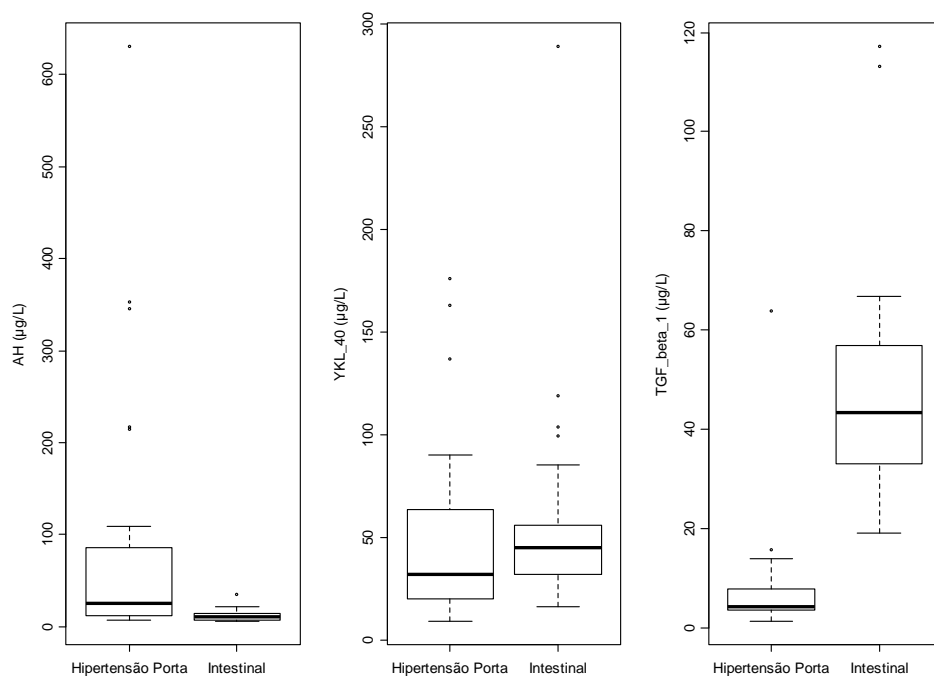
APENDICE E – RESULTADOS

Gráfico: Representação gráfica da comparação entre os valores obtidos na avaliação dos níveis séricos de AH, YKL40 e TGF-β1 entre os dois grupos de pacientes.