

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

ALBA OTONI

**PERFIL DE QUIMIOCINAS NA URINA E NO SORO DE PACIENTES COM A
GLOMERULOPATIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
HEPATOESPLÊNICA**

**Belo Horizonte, Minas Gerais
Brasil
2011**

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

ALBA OTONI

**PERFIL DE QUIMIOCINAS NA URINA E NO SORO DE PACIENTES COM A
GLOMERULOPATIA 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**

**Coorientador: Prof. Carlos Maurício
de Figueiredo Antunes
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2011**



Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

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

Tese intitulada “Perfil de quimiocinas na urina e no soro de pacientes com a glomerulopatia da esquistossomose mansônica hepatoesplênica” de autoria da doutoranda Alba Otoni, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Professor Doutor José Roberto Lambertucci – FM/UFMG – Orientador

Professor Doutor Carlos Maurício de Figueiredo Antunes – FM/UFMG – Coorientador

Professor Doutor Fausto Edmundo Lima Pereira – FM/UFES – Avaliador

Professora Doutora Carolina Coimbra Marinho – FM/UFOP -Avaliador

Professora Doutora Kátia Farah – FM/UFMG- Avaliador

Professora Doutora Fabiana Simão Machado – ICB/UFMG- Avaliador

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2011

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. José Roberto Lambertucci

Prof. Ricardo de Amorim Corrêa

Stella Sala Soares Lima (Disc. Titular)

Ao "Vi," razão da minha vida
Ao meu pai, eterno carinho a me iluminar
Á minha mãe, presença forte e incondicional

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre José Roberto Lambertucci por ser incansável na condução de descobertas, de alegrias pela aquisição do conhecimento e de abandono da ignorância.

Ao meu querido filho Vivi, pela ingênua compreensão de que a minha ausência é dedicada a estudos para me tornar uma verdadeira “cientista”.

Aos meus pais e irmãos Fabras, Jaque, Paula e Lé que mesmo de longe sempre foram o meu porto seguro, me apoiando nas minhas escolhas.

Aos meus sobrinhos, pela terna e companheira presença em minha vida.

Á “Té” pelo zelo e amor verdadeiro dedicados ao Vi, permitindo assim a minha realização profissional.

Á Isabellita por cuidar de mim e por estar presente em “todos” os momentos dessa jornada, fossem eles de angústias, desesperos ou vitórias

Ao professor Carlos Maurício por sua paciência, suas preciosas contribuições na construção do trabalho em todas as fases.

Ao Antônio Lúcio Teixeira pela presteza na realização dos experimentos.

Á Aline, bolsita do ICB, por sua disponibilidade em auxiliar na concretização dos experimentos.

Á Silvana Romano por sua presteza e resolutividade em ajudar em todas as situações que envolviam o meu trabalho.

Á Sandra pela sua despreziosa capacidade de ajudar e de encontrar as soluções quando tudo parecia muito difícil.

Á Marcinha pela disposição em me apoiar, me auxiliar nos momentos de aprendizado e por tornar possível a minha ausência no trabalho para dedicar-me a minha tese.

Á Vanessa Cortes por sua presença constante, por sua disponibilidade em tornar possível a minha ausência no trabalho para dedicar-me a minha tese.

Á Carol por ter me aberto os caminhos da imunologia.

Ao acadêmico Pedro por suas contribuições nos momentos de discussão.

Aos colegas Sílvio, Fred pelo companheirismo durante anos de aprendizado.

Tocando em frente

Ando devagar porque já tive pressa
 e levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs
 O sabor das maçãs e das maçãs

É preciso amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
 compreender a marcha, e ir tocando em frente
 como um velho boiadeiro levando a boiada,
 eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
 Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
e ser feliz

Almir Sater e Renato Teixeira.

RESUMO

Introdução: A glomerulopatia esquistossomótica tem sido descrita em cerca de 15% dos pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica. O surgimento de edemas, hipertensão arterial sistêmica e/ou proteinúria denunciam a presença da doença renal. Não há estudos sobre o perfil de quimiocinas no soro e urina destes pacientes. **Objetivo:** No presente estudo investigamos os valores de quimiocinas no soro e urina de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com e sem lesão renal com o objetivo de identificar um padrão sugestivo da lesão renal esquistossomótica. **Metodologia:** Este é um estudo transversal observacional e comparativo realizado entre outubro de 2008 e julho de 2010 no ambulatório de doenças infecciosas da Faculdade de Medicina da UFMG, em Belo Horizonte, Brasil. Cento e sessenta indivíduos, com mediana de idade de 40 anos, foram divididos em cinco grupos: 1) sessenta e oito pacientes tinham esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal; 2) doze tinham esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal; 3) vinte e sete tinham esquistossomose hepatointestinal; 4) vinte e dois tinham glomerulopatia de etiologias variadas; e 5) trinta e um indivíduos eram aparentemente saudáveis. Todos se submeteram a anamnese e exame clínico. Os participantes do estudo com albuminúria >30mg em 24 horas foram considerados como tendo doença renal. Em oito pacientes do segundo grupo confirmou-se o diagnóstico da glomerulopatia pela biópsia renal. O diagnóstico da esquistossomose hepatoesplênica baseou-se em dados epidemiológicos, clínicos, parasitológicos, e no ultrassom abdominal. O soro e uma amostra da urina de 24 horas dos participantes foram armazenados a -80°C. Dosaram-se as quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, IL-8/CXCL8, eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5 em amostras do soro e urina de todos os participantes utilizando-se o método de ELISA e Kits comerciais. As informações obtidas foram transferidas para o banco de dados EpiData 3.1 e analisados no programa SPSS. **Resultados:** Os pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e lesão renal apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 na urina >14,34pg/ml, MIP-1 α /CCL3 no soro >61,93pg/ml, IL-8/CXCL8 sérica <1030,40pg/ml, eotaxina urinária/CCL11 >26,73pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica >634,25pg/ml. Perfil semelhante foi encontrado nos pacientes com glomerulopatia de outras etiologias, mas a MCP-1/CCL2 sérica era \leq 634,25pg/ml em todos os pacientes. Os pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal apresentaram o seguinte perfil: MIP-1 α /CCL3 na urina <14,34pg/ml; MCP-1/CCL2 sérica <490,10pg/ml e RANTES <11.509,84pg/ml. Os participantes dos outros grupos apresentavam perfil diferente dos apresentados acima. **Conclusão:** O encontro de MCP-1/CCL2 sérica >634,25pg/ml sugere a esquistossomose como causadora da lesão renal.

Palavras-chave: esquistossomose mansônica, quimiocinas, proteinúria, glomerulonefrite.

ABSTRACT

Introduction: Renal involvement has been described in 15% of patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Peripheral edema, systemic arterial hypertension and/or proteinuria signal the presence of renal disease in such patients. There have been no studies on the profile of chemokines in the serum and urine of patients with schistosomal glomerulopathy. **Objective:** We investigated the sera and urine levels of chemokines in patients with hepatosplenic schistosomiasis, with and without renal disease, aiming at defining a profile which might suggest kidney injury on the course of hepatosplenic schistosomiasis. **Methodology:** This is a cross-sectional study developed at the Outpatient Clinic of the Infectious and Parasitic Diseases Unit, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, in Brazil, between October 2008 and July 2010. After informed consent, 160 volunteers with a median age of 40 years were enrolled in the study and divided into five groups: 1) sixty eight patients had hepatosplenic schistosomiasis mansoni without renal disease; 2) twelve had hepatosplenic schistosomiasis with renal disease; 3) twenty seven had hepatointestinal schistosomiasis; 4) twenty two had glomerulopathy of varied causes, without schistosomiasis; and 5) thirty one were apparently healthy. All participants were submitted to clinical examination. Those with microalbuminuria above 30mg in 24 hours were considered as having renal disease. In eight patients with microalbuminuria and schistosomiasis the presence of glomerulopathy was confirmed by renal biopsy. Diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis was established by the association of epidemiological, clinical, parasitological and ultrasound data. From all participants, sera samples and a small quantity of urine (taken from the 24 hour urine collected) were obtained and stored at -80°C. The sera and urine chemokines MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, IL-8/CXCL8, eotaxin/CCL11 and RANTES/CCL5 were measured using an ELISA test and commercial kits. Information obtained was transferred to a data bank (EpiData 3.1) and analyzed in the SPSS software. **Results:** In patients with hepatosplenic schistosomiasis and renal disease the following chemokine profile was found: MIP-1 α in the urine >14.3pg/ml, sera MIP-1 α >61.9pg/ml, IL-8 in the sera <1,030pg/ml, eotaxin in the urine >26.7pg/ml and sera MCP-1 >634pg/ml. A similar profile was observed in the group of patients with glomerulopathy caused by other diseases (without schistosomiasis), except for serum MCP-1 that was <634pg/ml. Patients with hepatosplenic schistosomiasis without renal disease presented the following profile: MIP-1 α in the urine <14.3pg/ml, serum MCP-1 <490pg/ml and RANTES <11,509pg/ml. The other groups presented different profiles. **Conclusion:** In cases with serum MCP-1 >634pg/ml the diagnosis of schistosomal glomerulopathy should be considered.

Key-words: schistosomiasis mansoni, chemokines, proteinuria, glomerulonephritis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
FIGURA 2 -	Par de vermes adultos em cópula permanente	23
FIGURA 3 -	Diferenciação Th1 e Th2	27
FIGURA 4 -	Esquema da formação de imunocomplexos e da deposição glomerular	33
FIGURA 5 -	Glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I.....	37
FIGURA 6 -	Árvore de decisão por meio do algoritmo CART avaliando os fatores associados aos grupos de estudo	73
FLUXOGRAMA 1-	Seleção de pacientes portadores da forma hepatoesplênica esquistossomose com e sem lesão renal - Outubro de 2008 a julho de 2010	53
FLUXOGRAMA 2 -	Pacientes portadores da forma hepatointestinal da esquistossomose -20 a 25 de julho de 2010	54
FLUXOGRAMA 3 -	Pacientes portadores de glomerulopatias por diversas causas comprovadas por biópsias renais e história negativa para esquistossomose - 01 de janeiro de 2010 a 31 de março	55
FLUXOGRAMA 4 -	Voluntários aparentemente saudáveis -01de dezembro de 2009 a 19 de dezembro de 2009.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Prevalência dos vários aspectos histopatológicos em biopsias renais de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica	32
TABELA 2 -	Prevalência dos vários aspectos histopatológicos em biopsias renais de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica.....	32
TABELA 3 -	Estatística descritiva das variáveis demográficas estudadas	99
TABELA 4 -	Estatística descritiva das medidas antropométricas	99
TABELA 5 -	Estatística descritiva dos níveis pressóricos e microalbuminúria.....	63
TABELA 6 -	Estatística descritiva das quimiocinas urinárias e séricas	64
TABELA 7 -	Associação entre as variáveis demográficas e os grupos participantes do estudo	100
TABELA 8 -	Comparação entre as variáveis: hipertensão arterial sistêmica, microalbuminúria de 160 indivíduos estudados no Hospital das Clínicas da UFMG, categorizados em 5 grupos, no período de outubro de 2008 a julho de 2010.....	64
TABELA 9 -	Associação entre as medidas antropométricas, pressão arterial sistólica e diastólica e os grupos participantes do estudo	101
TABELA 10 -	Associação entre as quimiocinas séricas e urinárias com os grupos participantes do estudo	66
TABELA 11 -	Comparações múltiplas das quimiocinas urinárias entre os grupos participantes do estudo	67
TABELA 12 -	Comparações múltiplas das quimiocinas séricas entre os grupos participantes do estudo	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFRAN -	<i>African Association of Nephrology</i>
ANCAc -	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos de distribuição citoplasmática
ANCAp -	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos de distribuição perinuclear
AT -	Amarelo turvo
CAA -	Antígeno anódico circulante
CART -	Classification and Regression Tree
CCA -	Antígeno catódico circulante
CICr calc -	<i>Clearance</i> de creatinina calculado
CTR-DIP -	Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias
CXCL8 -	Interleucina oito com resíduos separados por um aminoácido
CCL2 -	Proteína quimioatraente de macrófago um com resíduos contínuos
CCL3 -	Proteína inflamatória do macrófago um alpha com resíduos contínuos
CCL5 -	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
CCL11 -	Eotaxina com resíduos contínuos
CCR -	Receptores de quimiocinas com resíduos contínuos
CXCR -	Receptores de quimiocinas com resíduos separados por um aminoácido
COEP -	Comitês de Ética e Pesquisa
DIP -	Doenças Infecciosas e Parasitárias
EHE c/LR -	Esquistossomose Hepatoesplênica com Lesão Renal
EHE s/LR -	Esquistossomose Hepatoesplênica sem Lesão Renal
EPF -	Exame parasitológico de Fezes
Opg -	Ovos do parasita por grama de fezes
FMTM -	Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
FR -	Fator reumatóide
GESF -	Glomerulosclerose segmentar e focal
GN -	Glomerulonefrite
GN s/E -	Glomerulonefrite sem esquistossomose
GNMP -	Glomerulonefrite membrano-proliferativa
GM-CSF -	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
G-CSF -	Fator estimulador de colônia de granulócitos
HC-UFMG -	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE -	Hematoxilina-eosina
HI -	Hepatointestinal
HIV-1 -	Vírus da imunodeficiência humana do tipo um
IC -	Imunocomplexo
ICC -	Imunocomplexos circulantes
ICAM-1 -	Moléculas de adesão intercelular-um
IgA -	Imunoglobulina A
IgE -	Imunoglobulina E
IgG -	Imunoglobulina G
IgM -	Imunoglobulina M
IL -	Interleucina
IL-1 -	Interleucina – um
IL-4 -	Interleucina – quatro
IL-5 -	Interleucina – cinco
IL-8 -	Interleucina – oito
IL-10 -	Interleucina – 10
IL -11 -	Interleucina -11

IL-12 -	Interleucina-12
IL-17 -	Interleucina – 17
IL-23 -	Interleucina- 23
INF γ -	Interferon γ
IP-10 γ -	Interferon induzindo proteína 10 gama
II -	Intervalo interquartilico
LES -	Lupo eritematoso sistêmico
LFA -	Associados à função do linfócito
MCP-1 -	Proteína quimioatraente de monócito um
MIP-1 α -	Proteína inflamatória do macrófago um alpha
MIG -	monocina induzida por interferon
MBG -	Membrana basal glomerular
MDRD -	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
ME -	Microscopia eletrônica
MHC -	<i>Major histocompatibility complex</i>
mg -	<i>Miligrama</i>
mmHg -	<i>Milímetros de Mercúrio</i>
ND -	Nefropatia diabética
NK -	Natural Killer
NO -	Óxido nítrico
OMS -	Organização Mundial de Saúde
PAD -	Pressão arterial diastólica
PAI-1 -	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PAM -	Prata metenamina
PAS -	Pressão arterial sistólica
PDGF -	Fator do crescimento derivado de plaquetas
PS -	Picro-sírius
pH -	Potencial de Hidrogênio
Pg/ml -	Picograma por mililitro
RANTES -	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RCT -	Receptores de células T
RFG -	Ritmo de filtração glomerular
RNA -	Ácido ribonucléico
rpm -	Rotações por minuto
sAA -	Proteína sérica AA
SEA -	Antígenos solúveis do ovo
SN -	Serviço de nefropatologia
SPSS -	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SWAP -	Pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos de <i>S. mansoni</i> .
CD -	<i>Cluster of differentiation T</i>
TCLE -	Termo de compromisso livre e esclarecido
Th1 -	Células auxiliares um
T regs -	T reguladoras
TGF β -	Fator transformador do crescimento Beta
TM -	Tricômico de Masson
TNF α -	<i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i>
TRS -	Serviço de Terapia de Substituição Renal
UFMG -	Universidade Federal de Minas Gerais
VDRL -	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VS -	<i>Voluntários Saudáveis</i>

WHO - *World Health Organization*
 α SMA lisa - Alfa actina do citoesqueleto de célula muscular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Objetivos da pesquisa	21
1.1.2	Objetivo geral	21
1.1.3	Objetivos específicos.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	22
2.2	Imunologia da Esquistossomose	23
2.3	Nefropatia da esquistossomose mansoni	30
2.3.1	Aspectos epidemiológicos	30
2.3.2	Imunopatogênese da lesão glomerular em pacientes esquistossomóticos ...	33
2.3.2.1	Papel das citocinas na lesão renal	41
2.4	Efeito do tratamento da parasitose na evolução da nefropatia associada	45
2.5	Considerações finais	46
3	METODOLOGIA	49
3.1	Delineamento do estudo.....	49
3.2	Cálculo da amostra	49
3.3	Estudo piloto	49
3.4	População estudada	50
3.4.1	Os grupos	51
3.4.1.1	Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	51
3.4.1.2	Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	52
3.4.1.3	Esquistossomose hepatointestinal	53
3.4.1.4	Glomerulopatia sem esquistossomose	54
3.4.1.5	Voluntários saudáveis	55
3.5	Métodos	56
3.5.1	Exame físico	56

3.5.2	Ultrassonografia	56
3.5.3	Os exames de microalbuminúria	57
3.5.4	Exames das quimiocinas urinárias e séricas	57
3.5.5	Exame de fezes	58
3.5.6	Detecção dos níveis de anticorpos específicos contra antígenos de <i>S. mansonii</i> (SWAP)	58
3.6	Análise estatística	58
3.6.1	Análise descritiva	59
3.6.2	Análise univariada	59
3.6.3	Análise multivariada	59
3.6.3.1	Regressão logística	59
3.6.3.2	Árvore de decisão	60
3.6.3.3	Regressão linear.....	61
3.7	Considerações éticas	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Análises descritivas	63
4.2	Análises univariadas	64
4.2.1	Comparação entre os grupos	64
4.2.2	Análises de comparações múltiplas	66
4.3	Regressão logística	70
4.4	Regressão linear.....	70
4.5	Análise multivariada – Árvore de decisão.....	72
5	DISCUSSÃO	77
5.1	Medidas isoladas de quimiocinas em animais e pacientes com e sem lesão renal	77
5.2	Perfil de quimiocinas em animais e pacientes com e sem lesão renal	80
6	CONCLUSÕES	83
7	PROPOSIÇÕES	84

8	LIMITAÇÕES.....	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	APÊNDICES	99
	ANEXO	114

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose afeta atualmente pelo menos 240 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões vivem em áreas endêmicas situadas nos chamados países em desenvolvimento, possuidores de modestos recursos para o controle efetivo da helmintíase. Apenas na África Subsaariana são registradas 200 mil mortes anuais devidas à parasitose (WHO, 2011).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) no Brasil em 2009 a população infectada pelo *Schistosoma mansoni* chegou a 6.780.683 pessoas. Isto reflete uma média nacional de 0,07% da população brasileira infectada por esse helminto e desse total foram tratadas, naquele ano, 30.397 pessoas (WHO, 2011).

Quando não tratada a esquistossomose torna-se crônica, reduz a capacidade das pessoas para o trabalho e, em alguns casos, as complicações podem ser graves e resultar em morte. O envolvimento renal na esquistossomose mansônica, considerado como uma dessas complicações pode trazer uma evolução complexa da helmintíase, ampliando substancialmente o custo socioeconômico da doença. Em 1999, Barsoum afirmava que a despeito de uma epidemiologia que preocupava e exigia ações multiprofissionais no âmbito da saúde pública, o impacto sobre a prática nefrológica das muitas parasitoses endêmicas em regiões tropicais e subtropicais não era devidamente considerado. Ao que parece, o descaso com as complicações renais advindas da esquistossomose, 12 anos após essa constatação, ainda é uma realidade.

A prevalência do envolvimento renal na esquistossomose mansônica ainda não tem dimensões consensuais exatas na literatura disponível e, no Brasil, os números dessa medida estatística variam entre 4,5% a 15% (ANDRADE; QUEIROZ, 1968; BINA *et al*, 1985; BRITO, 1973; DE BRITO *et al*, 1999; LEHMAN *et al*, 1975; MARTINELLI; ROCHA, 1996; RABELLO *et al*, 1993; ROCHA *et al*, 1976; SOBH *et al*, 1990; ZATZ.; ROMÃO; NORONHA, 2003).

A diversidade geográfica, as múltiplas características étnicas e os diferentes critérios diagnósticos são possíveis fatores que justificam uma inconstância numérica nos dados relativos à prevalência de acometimento renal na esquistossomose mansônica. Em recente publicação, Rodrigues e colaboradores (2010) registram uma prevalência de 12,7% de acometimento renal em 63 pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose atendidos em ambulatório em Belo Horizonte- MG. Esses resultados mostram que a lesão renal associada à esquistossomose permanece como importante problema de saúde pública no Brasil.

Seguindo as tendências contemporâneas da nefrologia, afirma-se que independente dos valores exatos da prevalência, é imprescindível que se identifiquem métodos de detecção precoce da lesão renal em busca de uma intervenção também precoce que evite ou, no mínimo, retarde a instalação da doença renal crônica terminal (HAWKINS, 2011).

Nos últimos anos, estudos foram realizados buscando precisamente reconhecer os mecanismos capazes de desvelarem o acometimento renal o mais cedo possível. A alteração no perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com lesão renal, de causas variadas, pode contribuir para o surgimento da proteinúria e posterior lesão glomerular de amplo espectro (ARAYA *et al.*, 2006; GARIN, 2000; VAIDYA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, vários autores têm dedicado seus estudos ao conhecimento do papel das citocinas/quimiocinas séricas e urinárias na lesão do parênquima renal. Algumas citocinas, em especial as quimiocinas, têm recebido destaque nas publicações atuais. Dentre elas, a MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, mostraram-se presentes em grande quantidade em rins de pacientes portadores de doenças glomerulares progressivas, rejeições a transplantes e nefrites intersticiais ou mesmo níveis aumentados em vigência da proteinúria (ARAYA *et al.*, 2006; SEGERER, 2003). A IL-8/CXCL8 foi observada em níveis séricos e urinários aumentados durante episódios de recidiva da síndrome nefrótica (CHO *et al.*, 2003; VAN DEN BERG; WEENING, 2004).

No que se refere à glomerulopatia esquistossomótica os trabalhos que caracterizam o comprometimento renal são escassos. Talvez isso ocorra porque ainda resta a dúvida, conforme enfatizado por Correia e colaboradores (1997), sobre o desaparecimento da glomerulopatia da esquistossomose mansônica em função da quimioterapia em massa para tratamento dessa helmintíase e consequente controle da forma hepatoesplênica da esquistossomose (CORREIA; MARTINELLI; ROCHA, 1997). Porém, na prática diária no ambulatório Centro de Treinamento e Referência de doenças infecciosas do Orestes Diniz da Universidade Federal de Minas Gerais (CTR/UFMG) acompanhamos atualmente 120 pacientes portadores de esquistossomose hepatoesplênica. O acometimento renal na esquistossomose, a nosso ver, ainda é negligenciado e não há definição até o presente momento de marcadores laboratoriais capazes de identificar a glomerulopatia desencadeada pela esquistossomose, principalmente na fase subclínica da doença.

O presente estudo teve como objetivo identificar perfil das quimiocinas na urina e no soro de pacientes com a glomerulopatia da esquistossomose mansônica hepatoesplênica com a finalidade de identificar marcadores precoces da lesão renal em pacientes com a simultaneidade da lesão renal e esquistossomose hepatoesplênica. Foi realizado no ambulatório Orestes Diniz da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, centro de referência para tratamento de doenças infecto-contagiosas e parasitárias no estado de Minas Gerais. As quimiocinas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5 e eotaxina/CCL11, dos pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose com e sem lesão renal foram estudados. Os integrantes desse estudo são originários, na sua grande maioria, de zonas endêmicas que abrangem as regiões do centro, norte e nordeste do estado de Minas Gerais.

1.1 Objetivos da pesquisa:

1.1.2 Objetivo geral:

Definir o perfil de quimiocinas na urina e no soro de pacientes com a glomerulopatia da esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

1.1.3 Objetivos específicos:

1. Mensurar os níveis das quimiocinas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5 em amostras do soro e da urina de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e lesão renal (grupo EHE c/LR).
2. Mensurar os níveis séricos e urinários das mesmas quimiocinas dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal (grupo EHE s/LR), com esquistossomose hepatointestinal (grupo HI), com glomerulopatias de várias etiologias (grupo GN s/E) e em indivíduos voluntários aparentemente saudáveis (grupo VS).
3. Comparar os níveis séricos e urinários das mesmas quimiocinas entre os cinco grupos.

Hipótese – Pacientes com glomerulopatia esquistossomótica possuem um perfil de quimiocinas sérico e urinário específico que caracteriza precocemente a lesão renal?

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções pelo *Schistosoma mansoni*

A infecção do hospedeiro humano ocorre pela penetração da cercaria do *S. mansoni* na pele intacta quando o mesmo está em contato com águas contaminadas (FIG. 1). A partir desse momento o parasita sofre rapidamente uma série de alterações na sua estrutura morfológica, bioquímica e antigênica e se transforma em esquistossômulo. Após cerca de três dias no tecido subcutâneo, o esquistossômulo entra na circulação sanguínea e linfática, alcançando o coração e os pulmões. Através dos capilares pulmonares chega ao coração esquerdo e então à circulação sistêmica, alojando-se nas artérias mesentéricas, esplênicas e sistema porta hepático onde, entre uma e quatro semanas, se torna verme adulto, com 1 a 2 cm de comprimento. As formas adultas migram contra a circulação portal e entram também nas vênulas mesentéricas do cólon, permanecendo nestes locais por longos anos e, por vezes, sem produzir lesão de grande impacto (FUNASA, 2001; NEVES, 1991; STAVITSKY, 2004)

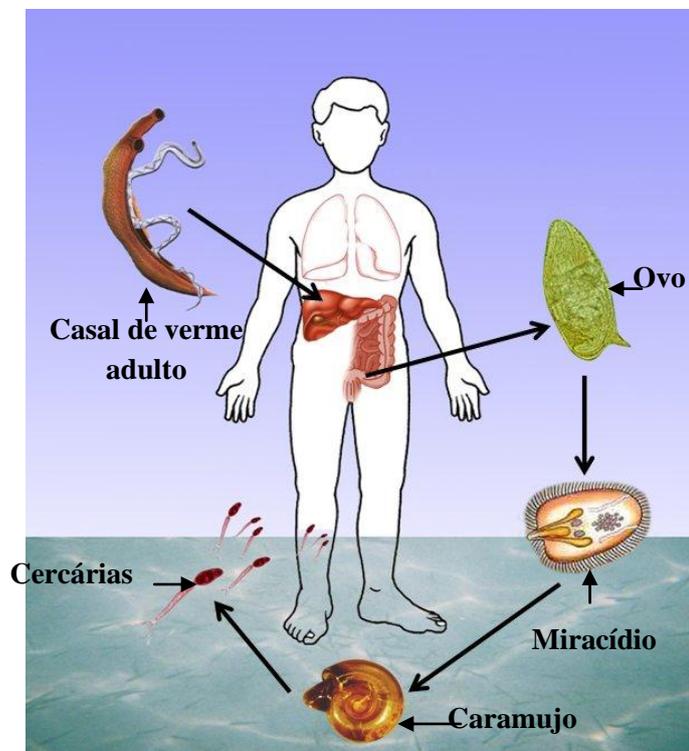


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*
Fonte: José Roberto Lambertucci

Os adultos vivem em cópula permanente fixados à parede dos vasos sanguíneos e após um a três meses iniciam a ovoposição (FIG. 2). Os ovos espiculados típicos do *S. mansoni* atravessam a parede dos vasos entram nos tecidos e, quando perfuram a estrutura da parede colônica, aparecem nas fezes (FUNASA, 2001; NEVES, 1991). Os ovos contêm formas larvárias imaturas de miracídios (fêmea ou macho), que são liberadas na água quando a casca se rompe cedendo à pressão osmótica. Os miracídios penetram no caramujo, hospedeiro intermediário, *Biomphalaria sp* no caso do *S. mansoni*, onde se reproduzem assexuadamente. Entre três e cinco semanas surgem os esporocistos e então as cercarias, que penetram no hospedeiro final (o homem), fechando o ciclo de vida (FUNASA, 2001; NEVES, 1991; STAVITSKY, 2004).

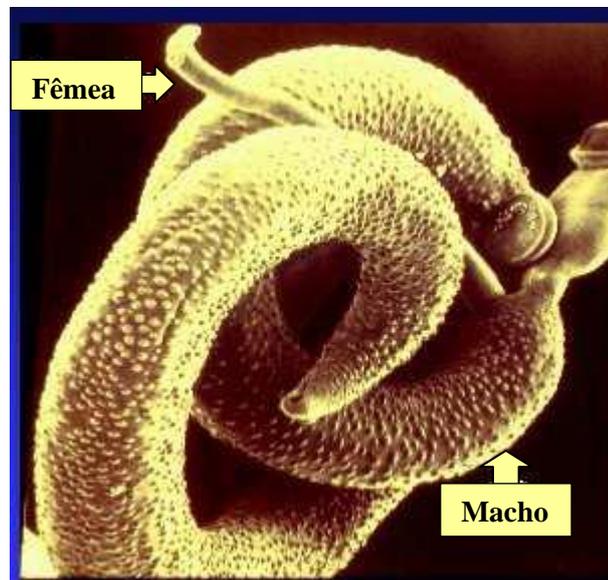


FIGURA 2 - Par de vermes adultos em cópula permanente.
Fonte: Barsoum (1999).

2.2 Imunobiologia da esquistossomose mansônica

A interação entre células linfóides do hospedeiro e produtos antigênicos do helminto, ao longo dos estágios de sua evolução natural, modula a histopatologia e a expressão clínica da infecção humana pelo *S. mansoni*. Mesmo com as manifestações clínicas bem descritas na literatura, os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento dessa patologia ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que ao longo do seu ciclo de vida no homem, o par de *S. mansoni* produz aproximadamente 100 moléculas antigênicas, a maior parte

caracterizada, codificada, sequenciada e preparada por técnicas de recombinação (BARSOUM, 2004). Os antígenos proteoglicanos do intestino do verme são: antígeno catódico circulante (CCA) e o antígeno anódico circulante (CAA).

A resposta de defesa imediata da qual participam células fagocitárias do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) é estimulada ao contato inicial do sistema imune do hospedeiro com *S.mansoni*. A partir deste evento inicial, geralmente ineficaz para a eliminação do patógeno invasor, surge uma resposta adaptativa, complexa, caracterizada pela especificidade antigênica e pela aquisição de uma memória imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Stavitsky (2004) mostrou que a capacidade de reconhecimento antigênico, a amplitude da produção consequente de anticorpos e do desenvolvimento de subgrupos de células T CD 4⁺ (*cluster of differentiation*) são geneticamente controlados.

A história natural da parasitose, em especial no Brasil, pode ser descrita por uma fase aguda três a nove semanas após a primo-exposição do homem à cercaria, identificada também como “febre toxêmica”, similar à síndrome da doença do soro. Caracteriza-se por febre, prostração, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e perda de peso, cefaleia, tosse seca, graus variados de hepatoesplenomegalia, leucocitose e eosinofilia (MARTINS-FILHO et al, 1999).

A evolução da infecção para cronicidade não é um processo homogêneo e duas formas clínicas distintas são observadas. A primeira, forma dita hepatointestinal, predominante nas regiões endêmicas, oligossintomática, que parece surgir após quiescência dos mecanismos imunológicos e síndrome clínica, de intensidade variável, compõe-se de adinamia, fadiga crônica, dor abdominal difusa e diarreia intermitente; a segunda, a forma crônica hepatoesplênica, mais grave e sintomática, caracteriza-se pelo crescimento de fígado e baço em graus variados, fibrose periportal, hipertensão porta e varizes gastroesofagianas (FUNASA, 2001; LAMBERTUCCI et al, 2000; NASH, 1991). Ao observar a diversidade clínica da infecção, não é difícil supor que a resposta imune do hospedeiro seja também plural, própria e característica do infectado. Uma das primeiras observações publicadas a esse respeito foi de Martins-Filho *et al* (1999). Avaliando *in vitro* a reatividade de linfócitos T e B

do sangue periférico obtido de pacientes que expressavam as diversas formas clínicas da doença, quando estimulados por antígenos solúveis do ovo (SEA), observaram importante heterogeneidade. Comparados aos controles não infectados, em estudos *in vivo*, o número de células T CD3⁺ circulante foi menor nos pacientes na fase aguda e crônica hepatoesplênica. Uma outra análise dos subgrupos de células T mostrou redução expressiva da população T CD4⁺ em todas as fases da doença, contudo, apenas os portadores da forma hepatoesplênica tinham também número reduzido de células circulantes CD8⁺. Todos os pacientes infectados, particularmente os da forma crônica hepatoesplênica, apresentaram expressivo aumento de células B CD19⁺ quando comparados aos controles. Esses achados confirmaram a diversidade clínica da infecção, própria e característica do infectado.

A ativação das células T estimulada por antígenos é dependente da interação de seus receptores (RCT – receptores de células T) com peptídeos MHC (complexo de histocompatibilidade) presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos e da participação de pelo menos um sinal coestimulatório produzido pela interação de outras moléculas presentes na membrana de ambas as células. A interação CD28/B7 é considerada a principal coestimulação na ativação primária do linfócito T. A expressão de CD28 na superfície das células CD4⁺ e CD8⁺ foi analisada por Weir e Stewart (2002) para, assim, dimensionar a capacidade funcional dessas células. Ainda que os níveis absolutos de CD4⁺CD28⁺ estivessem ligeiramente reduzidos em todas as formas clínicas da doença, a relação CD4⁺CD28⁺/CD4⁺ não se alterou, sugerindo capacidade funcional preservada dessa subpopulação de células (WEIR; STEWART; 2002). A análise da expressão de CD28 na superfície das células CD8⁺ surpreendeu os autores, uma vez que o grau de ativação encontrado não foi o esperado em infecções helmínticas extracelulares. Tanto a expressão de CD28 como a capacidade funcional dessas células não foram as mesmas em todos os subgrupos de pacientes. Pacientes portadores da forma crônica hepatoesplênica mostraram níveis reduzidos de CD8⁺CD28⁺ bem como baixa relação CD8⁺CD28⁺/CD8⁺ (WEIR; STEWART, 2002). Esses achados sugerem uma atividade funcional defeituosa das células CD8⁺ nesse subgrupo de pacientes, fato explicado pelos autores como a falta de eventos imunomoduladores observados na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. Em suma, nesse trabalho, preconizou-se que o nível das células CD4⁺ ativadas pode se correlacionar com as formas ativas e sintomáticas da esquistossomose (febre toxêmica e

forma crônica hepatoesplênica). O surgimento de uma forma crônica menos agressiva, estável e oligossintomática está associada a níveis reduzidos de $CD4^+CD28^+$. Os muitos estados de ativação da subpopulação de $CD4^+$ podem também ser consequência das diferentes reações das células $CD8^+$ à estimulação antigênica, variando sua ação moduladora na ativação $CD4^+$ e proporcionando o surgimento de formas clínicas diversas (WEIR; STEWART, 2002). O conhecimento atual mais abrangente da resposta imune permite um delineamento ainda mais detalhado da interação do sistema imunológico do homem com os antígenos esquistossomóticos. É nessa interação finamente equilibrada que repousa a possibilidade de uma longa sobrevivência do hospedeiro, interessando aqui o homem, persistentemente infectado (Mac DONALD; ARAÚJO; PEARCE, 2002).

A infecção esquistossomótica nos camundongos difere em alguns aspectos da observada em humanos e primatas, especialmente no número de vermes por unidade de peso corporal e na distribuição da deposição do ovo entre a circulação hepática e mesentérica. Porém, a característica inflamação granulomatosa da infecção, sua composição celular e sua modulação imunológica são comuns a todas as espécies, fato que confere relevância necessária aos resultados obtidos nos experimentos em camundongos (FALLON *et al*, 2000; HOUBA, 1979). Reiterando, a atividade imune inicial tem como alvo antígenos do tegumento da cercária e caracteriza-se pela estimulação da ação fagocitária das células dendríticas da pele, pela formação de espécies reativas de oxigênio e pela produção de lisozimas. O surgimento subsequente dos esquistossômulos amplia sistemicamente as reações inespecíficas próprias da imunidade inata, que incluem particularmente a ativação de monócitos fagocitários, das células T *natural killer* e a ativação do sistema de complemento (BARSOUM, 2004). Os antígenos envolvidos nessa reação inicial são um grupo de proteínas e glicoproteínas que, embora pouco relevantes na produção da doença final, têm importância fundamental no desenvolvimento da imunidade à reinfeção. Esse contato inicial elimina algo em torno de 90% da carga parasitária (BARSOUM, 2004). Os trabalhos de Wahl e colegas (1997), Sher; McIntyre; Von Lichtenberg (1977) e CHEEVER *et al* (1994), também utilizando um hospedeiro permissivo do *S. mansoni*, o camundongo, definiram com propriedade outros aspectos relevantes da imunopatogenia da doença. A transformação do esquistossômulo em verme adulto cumpre o dever final do parasita e sinaliza o início da ovoposição. O ovo surgido é capaz de liberar sinais quimiotáticos que recrutam e ativam leucócitos,

particularmente macrófagos (WINN; CHEEVER, 1995). Lukacs, *et al* (1994) sugeriram que a amplificação da resposta inflamatória pode ser mediada a partir da fixação de macrófagos na superfície do endotélio vascular. Produtos macrofágicos da reação inflamatória inicial, particularmente fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), ativam as células endoteliais que passam a expressar, de forma exuberante, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1). Essas moléculas se ligam às integrinas presentes na superfície de células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e aos receptores associados à função do linfócito (LFA-1) (YANG, *et al*, 2005). Fixadas, estas células passam a liberar grande quantidade de citocinas quimiotáticas e próinflamatórias, as interleucinas IL-12, IL-1 β e IL-6, capazes de atrair um número crescente de outras tantas células que se comprometem com a resposta inflamatória. Linfócitos CD4 precursores (Th0) são quimioatraídos e se acumulam no sítio inflamado e, ativados também pelo SEA, liberam proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1/CCL2), proteína inflamatória do macrófago 1 alfa (MIP-1 α / CCL3) e interferon alfa ($IFN\alpha$). Assim atraídos e fixados, os macrófagos e as células dendríticas apresentadoras de antígenos, ativados, disparam uma sequência de fenômenos imunológicos específicos, culminando com a ativação e diferenciação de células T CD4+ (células T efectoras). Dessa forma, a imunidade adaptativa se soma à imunidade inata para a erradicação do patógeno. Tal sequência ocorre em duas etapas distintas: uma fase precoce Th1 e uma tardia, quando predominam células Th2 (FIG. 3).

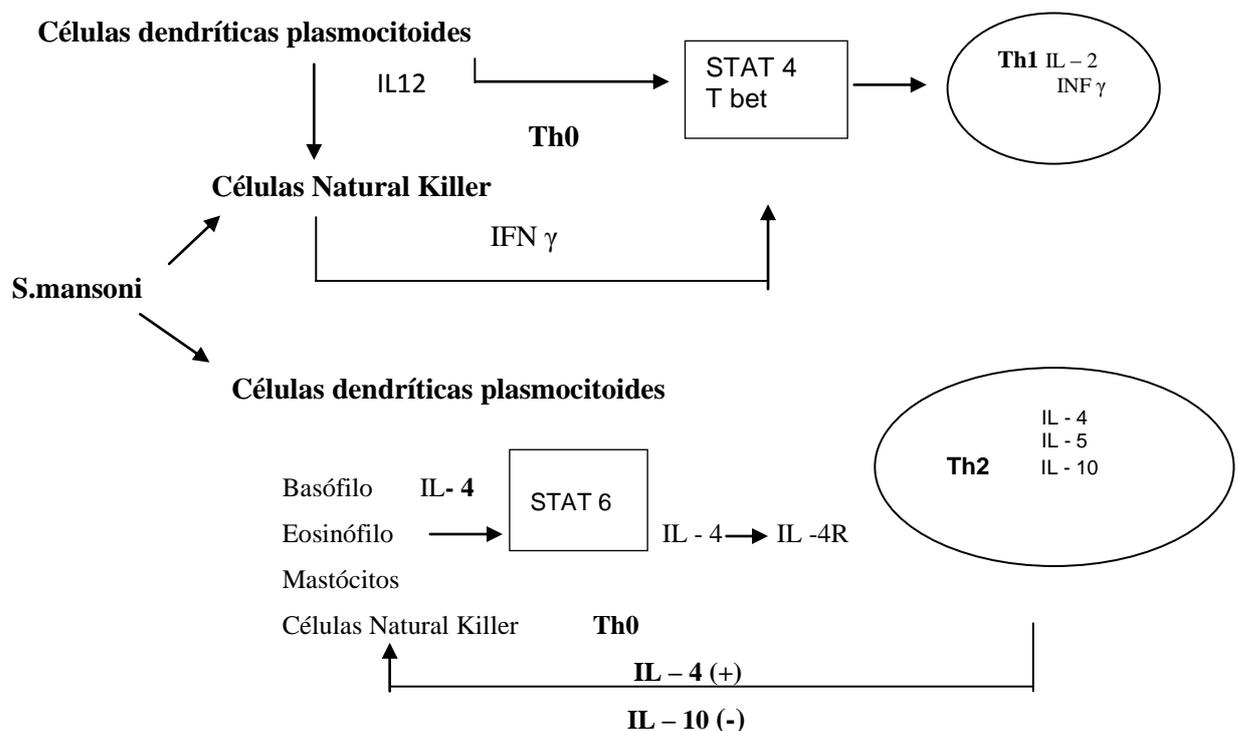


FIGURA 3 – Diferenciação Th1 e Th2.
Fonte: Weaver *et al* (2007).

A diferenciação inicial da célula Th0 precursora, no subgrupo específico Th1, é logo suprimida e redirecionada para o subgrupo Th2 (WINN; CHEEVER, 1995). Esse fenômeno é condicionado por vários fatores do hospedeiro (FLORES VILANNUEVA et al, 1994; KAPLAN et al, 1998), mas também por estímulos próprios do ovo (BAUMGART, et al, 2006; HESSE et al, 2004; OKANO et al, 2001), e caracteriza-se pela expressão particular de IL-4, IL-5, IL10 e IL-13. Essas citocinas têm funções peculiares na história natural da doença: IL-4 e IL-13 estão implicadas na formação do granuloma, IL-13 estimula fortemente a fibrose tecidual e IL-5 é sempre necessária para o recrutamento amplo de eosinófilos. A diferenciação Th2, característica das infecções helmínticas, resulta também, como visto, de estímulos do próprio patógeno e sua expressão final é regulada pela IL-10 (FLORES VILLANUEVA et al, 1994; HESSE et al, 2004).

Estudos mais atualizados sobre a IL-10 mostram sua origem múltipla: células próprias da imunidade inata e células T reguladoras (T regs) identificadas como CD4+ CD25+ (HESSE et al, 2004). Existem fortes evidências, obtidas em modelos de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, de um efeito direto das células T regs de ocorrência natural (T CD4+ Foxp3+) sobre as células T CD4+, limitando a produção de citocinas efetoras (BAUMGART et al, 2006) e, conseqüentemente, freando a atividade inflamatória.

Em suma, propõe-se que a infecção do hospedeiro pelo *S. mansoni* resulte na deposição de ovos no sistema porta e seu aprisionamento subsequente nos espaços perisinusoidais do parênquima hepático. A partir de então, os ovos passam a secretar, através de microporos da casca e de forma continuada, antígenos solúveis que engendram uma estimulação imune persistente, anunciada pelo recrutamento de leucócitos e ativação de resposta inflamatória complexa. Nesse momento, as substâncias mais imunogênicas são um peptídeo denominado *Sm p40*, que induz resposta Th1 predominante, e dois outros, descritos mais recentemente, *Sm fosfoenolpiruvato (Sm-PEPCK)* e a *thioredoxina peroxidase-1 (Sm-Tpx-1)*, que induzem resposta dual, contudo, assimétrica Th1/Th2 (BARSOUM, 2004).

A eliminação antigênica é caracteristicamente lenta, demandando resposta imune persistente, cuja evolução culmina com a formação do granuloma característico. Essa inflamação sustentada, que tem como seqüela a fibrose periportal, é regulada por citocinas expressadas por células linfóides do subgrupo Th2 predominante (WINN; CHEEVER, 1995). Os vários ensaios que buscam inibir a atividade das muitas citocinas presentes no sítio inflamado, a partir de anticorpos específicos ou da deleção gênica em modelos animais, mostram que é possível influenciar profundamente a formação do granuloma.

A expressão Th2 predominante é bastante característica de parasitas extracelulares, contrapondo-se à expressão Th1 de patógenos intracelulares. Definitivamente implicada na imunopatogenia da infecção pelo *S. mansoni* é crucial para a redução da gravidade do processo infeccioso agudo e para a sobrevivência do infectado (HESSE *et al*, 2004).

O abrandamento da fase aguda e o desenvolvimento de uma forma crônica menos agressiva (forma crônica intestinal) são conseqüências da redução na atividade celular inflamatória, provavelmente também efetuada pelo próprio helminto por meio de glicoconjugados específicos, como a *Lacto-N- neotetraose* (TERRAZAS *et al*, 2001).

A habilidade do *S. mansoni* por meio desses oligossacarídeos conjugados em aumentar rapidamente essa subpopulação de células supressoras pode ser um dos mecanismos utilizados por esse helminto para modular a resposta do hospedeiro e induzir certa anergia imunológica. Agindo sobre os macrófagos, tais conjugados estimulam a produção de IL-10, peptídeo regulador da intensidade da resposta Th2, minimizando a imunoatividade e suprimindo a expressão de quadros alérgicos secundários à produção de imunoglobulina E (IgE) (ATOCHINA *et al*, 2001).

Os linfócitos B também são ativados em duas fases ou etapas distintas, criando dois perfis diferentes de anticorpos associados à infecção esquistossomótica. Inicialmente, há predomínio de anticorpos com alta capacidade de fixar complemento e nesse momento tem particular

importância a imunoglobulina E (IgE), necessária para a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo, com a participação também decisiva de eosinófilos. As imunoglobulinas G, Ig G1 e IgG3 são também importantes nesta fase, pois, com alta afinidade pelas proteínas do complemento, catalisam a citotoxicidade dependente de complemento e anticorpo, mediada por neutrófilos. A ativação do sistema de complemento se dá nesse momento pela via alternativa, na perspectiva de uma resposta inata à toxina do parasita (BARSOUM, 1999). Numa segunda etapa passam a predominar anticorpos com pobre afinidade pelas proteínas do sistema de complemento.

2.3 Nefropatia da esquistossomose mansônica

2.3.1 Aspectos epidemiológicos

A relação entre a infecção pelo *Schistosoma mansoni* e a glomerulopatia foi descrita há poucas décadas, com os trabalhos pioneiros de Pirajá da Silva, na Bahia em 1908. Naquela época, Pirajá alertou para a presença de alterações na urinálise em alguns pacientes portadores de esquistossomose mansônica, identificando proteinúria em cinco de 20 pacientes infectados (*apud* MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006).

Somente em 1942, quando Rodriguez (*apud* MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006) avaliou, de maneira minuciosa, as alterações na composição urinária e na função renal dos pacientes infectados, uma relação entre parasitose e envolvimento renal foi salientada de modo mais significativo. Os mediadores da lesão renal foram denominados por ele e, mais tarde, por Gelfand (1963) de “fatores tóxicos”, referindo-se a possíveis toxinas produzidas pelo *S. mansoni*.

Vinte anos após estes achados, López (1964), em Minas Gerais, demonstrou em dados de seu estudo com pacientes hospitalizados, portadores da forma hepatoesplênica da doença que: 26,7% apresentaram alterações urinárias caracterizadas por proteinúria, hematúria e

cilindrúria, sendo que tais alterações foram observadas em apenas em 3,8% dos portadores da forma hepatointestinal. O resultado das biópsias renais de 16 destes pacientes mostrou que em seis deles havia acometimento glomerular mesangial e intersticial. O inusitado da observação foi que os achados se referiam a pacientes sem história pregressa de nefropatia. Um ano depois, 1965, Machado, em Pernambuco, descreveu expressiva proteinúria em pacientes esquistossomóticos também sem nenhum sinal ou manifestação clínica de doença renal ou hipertensiva. Um achado de destaque nesse estudo foi a primeira referência à possível presença de anticorpos relacionados ao *S. mansoni*.

Andrade e Queiroz (1968) em estudos de necropsia descreveram achados histopatológicos sistematizados da doença renal esquistossomótica. Relataram lesão glomerular caracterizada por espessamento focal da membrana basal e proliferação do mesângio. De Brito *et al* (1969), em biópsias renais de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem sinais clínicos de doença renal que se submeteram a esplenectomia, enfatizou, à microscopia eletrônica (ME), alterações mesangiais (hiperplasia e hipertrofia) e depósitos eletrondensos na membrana basal glomerular. A possibilidade de envolvimento renal subclínico na esquistossomose mansônica hepatoesplênica foi reforçada por Silva *et al* (1970) quando ao analisar amostras de biópsias renais de oito pacientes que também não apresentavam qualquer manifestação clínica de nefropatia, percebeu depósitos eletrondensos na membrana basal glomerular bem como imunofluorescência direta positiva para IgG e IgM. De Brito, Gunji e Camargo (1970) ao analisar material de biópsia renal obtido de 11 pacientes com sinais evidentes de acometimento renal (síndrome nefrótica, hipertensão arterial e diminuição do ritmo de filtração glomerular), identificaram, à microscopia óptica, um processo inflamatório e proliferativo do tufo glomerular e à microscopia eletrônica confirmaram os achados anteriores de depósitos eletrondensos na espessura da membrana basal glomerular. A imunofluorescência direta mostrou depósitos de imunoglobulinas e frações do complemento no mesângio e ao longo da parede capilar glomerular.

Seis anos mais tarde, Rocha, Cruz e Brito (1976) realizaram biópsias em dois grupos de pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica: o primeiro grupo formado por 10 doentes com evidências laboratoriais de envolvimento renal e um segundo

grupo, com 15 pacientes, sem qualquer sinal clínico-laboratorial de lesão renal. O primeiro grupo foi caracterizado pela presença de glomerulonefrite membranoproliferativa e o segundo pela ocorrência menos frequente, mas presente, de glomerulonefrite na forma mesângio-proliferativa.

Outros estudos se seguiram sugerindo de forma pouco precisa a ocorrência de várias formas histológicas de glomerulopatias atribuídas à esquistossomose mansônica hepatoesplênica. Uma análise de prevalência das diferentes lesões renais foi primeiro publicada por Andrade, Andrade e Sadigursky (1971), após revisão de amostras de tecido renal obtidas de 80 necropsias (TAB. 1).

TABELA 1 - Prevalência dos vários aspectos histopatológicos em biopsias renais de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica

GN mesângio-proliferativa leve	46,3%
GN mesângio-proliferativa com nítida expansão do mesângio	36,3%
GN proliferativa difusa lobular	10,0%
Sem referências específicas	7,4%

Fonte: Andrade, Andrade e Sadigursky (1971).

Queiroz, Brito e Martinelli em 1973, estudando tecido renal obtido de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica com síndrome nefrótica, descreveram a prevalência de glomerulopatias incluindo dados de revisão da literatura (TAB. 2).

TABELA 2 - Prevalência dos vários aspectos histopatológicos em biópsias renais de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica

GN membrano-proliferativa	73,0%
Glomerulosclerose focal e segmentar	20,0%
Nefropatia membranosa	6,7%

Fonte: Queiroz, Brito e Martinelli (1973).

2.3.2 Imunopatogênese da lesão glomerular em pacientes esquistossomóticos

Os mecanismos imunológicos da lesão glomerular que acompanham principalmente as formas hepatoesplênicas da esquistossomose mansônica estão bem estabelecidos. Há um consenso desde os trabalhos originais de De Brito *et al* (1969), de que essas nefropatias têm sido consideradas glomerulonefrites desencadeadas pelo depósito de imunocomplexos no mesângio e nas alças capilares glomerulares, ocasionando o processo inflamatório crônico (ANDRADE; ROCHA, 1979; BARSOUM, 1993). A possibilidade da formação *in situ* de imunocomplexos, quando os anticorpos circulantes se ligam a antígenos “plantados” passivamente nos glomérulos, também é considerada. Trata-se, pois, de uma agressão tissular mediada fundamentalmente pela resposta imune humoral (FIG.4) Conforme já descrito no item imunologia da esquistossomose mansônica, durante seu ciclo de vida no homem, o parasita produz grande quantidade de moléculas antigênicas envolvidas com a imunopatogenia da infecção e com a imunidade suscitada. (BARSOUM, 1993).

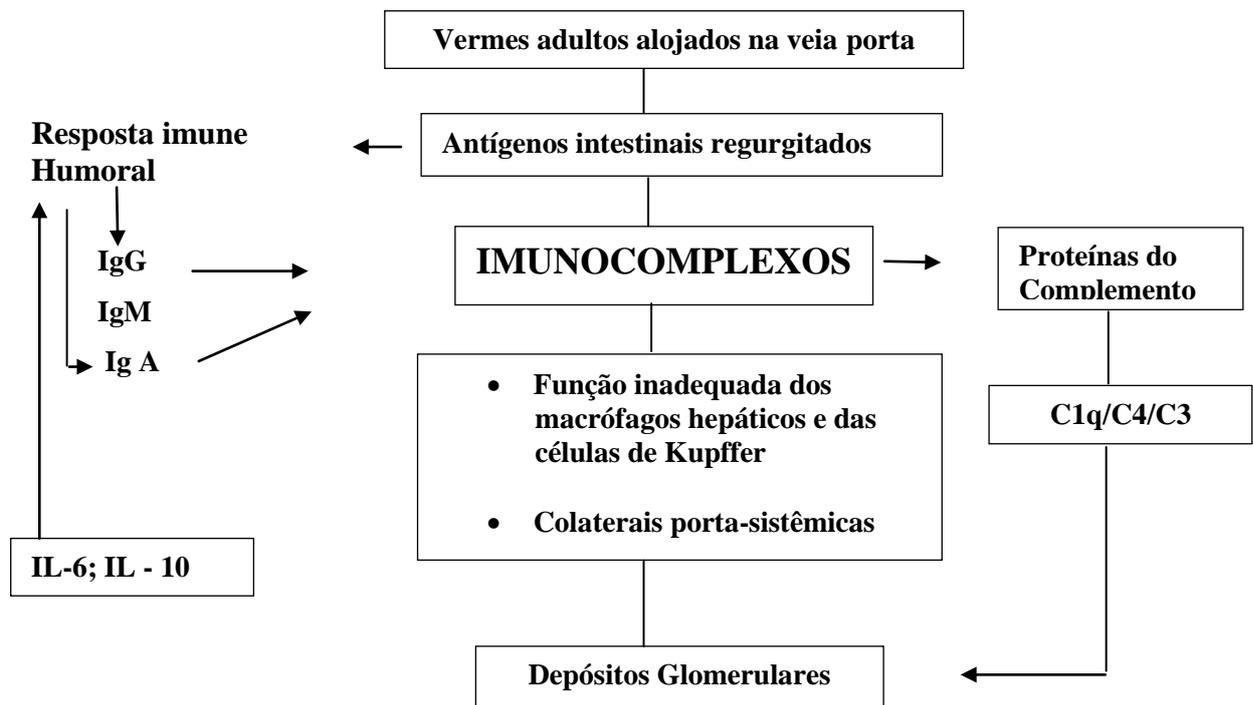


FIGURA 4 - Esquema da formação de imunocomplexos e da deposição glomerular.

Fonte: Barsoum (1999).

Nash, Prescott e Neva (1974) e Nash (1974) sugeriram, originalmente, a importância de antígenos provenientes do tubo digestivo do verme adulto, regurgitados pelo parasita na

gênese da nefropatia. Corroborando os autores acima citados e edificando a informação inicialmente sugerida, Hoshino-Shimizu *et al* (1977), Moriearty e Brito (1977), Deelder *et al* (1980), Sobh *et al* (1987) e De Brito (1999) eluíram os antígenos diretamente dos glomérulos acometidos: antígeno anódico circulante (CAA) e antígeno catódico circulante (CCA). Sobh *et al.* (1988a) descreveram também esses antígenos encontrados em 65,4% dos pacientes que manifestavam o acometimento glomerular através de proteinúria nefrótica, refletindo possivelmente quadros histológicos mais graves, e em 43,7% dos pacientes não-nefróticos. Naqueles que já apresentavam algum grau de insuficiência renal, a demonstração de tais antígenos também foi muito mais comum: 63,4%.

No tecido renal predominam os antígenos catódicos circulantes/CCA atraídos e fixados talvez pela camada polianiônica, de heparan sulfato e ácido siálico, moléculas constitutivas dos elementos formadores da parede capilar. Oriundos da circulação ou formados *in situ*, os imunocomplexos dão origem a uma reação inflamatória que culmina na desorganização da estrutura glomerular determinante da proteinúria, hematúria e da perda da função excretora (DEELDER *et al*, 1980; SOBH *et al*, 1987; SOBH *et al*, 1988a).

Relação entre o grau de fibrose hepática e a intensidade da lesão glomerular foi observada por Barsoum *et al* (1988). Os autores avaliaram a função dos macrófagos hepáticos, utilizando-se de uma técnica específica de depuração de tecnécio 99 e obtiveram boa correlação entre o grau de disfunção fagocitária e a intensidade da proteinúria e da proliferação de células mesangiais.

A maior prevalência da nefropatia nas formas hepatoesplênicas pode estar relacionada com a hipertensão portal e a circulação colateral no sistema porta em decorrência do grau de envolvimento hepático. Van Marck, Deelder e Gigase (1977), observaram que em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, ao induzir circulação colateral porta-sistêmica através da ligadura parcial da veia porta, os depósitos mesangiais de imunoglobulinas M, A, G e de C3 aumentaram substancialmente. Concluíram que a circulação colateral porta-sistêmica, facilitando a diversificação de imunocomplexos do sistema fagocitário hepático, é

um importante fator na gênese da glomerulopatia associada, pois, dessa forma, o acesso do material antigênico à circulação sistêmica e ao glomérulo seria bastante facilitado.

O mesmo fenômeno poderia explicar a ocorrência ocasional de lesão glomerular nas formas hepatointestinais, uma vez que Homeida *et al* (1988), por meio da ultrassonografia convencional, demonstraram hipertensão portal e colaterais porta sistêmicas em pacientes sem esplenomegalia e fígado pouco ou nada aumentado.

Uma resposta imune humoral, caracterizada predominantemente pela maior expressão de imunoglobulina M dirigida contra marcadores intestinais (IgM antiigliadina), é fenômeno já bem descrito. Barsoum *et al* (1996), contudo, referiram maior e significativa prevalência de imunocomplexos formados por IgA durante o desenvolvimento da fase crônica da doença, em especial da forma hepatoesplênica. Essa situação pode ser devida à reação imune aos antígenos alimentares não devidamente fagocitados pelos macrófagos da mucosa, inibidos por antígenos parasitários. Num estudo envolvendo populações da África, região de baixa prevalência de nefropatia primária por IgA, os níveis aumentados de IgA, IgA-antiigliadina e antiDNA ganharam mais significado. Os autores salientam não apenas uma produção preferencial de IgA por células B comprometidas, num movimento induzido por IL-6 e IL-10 anotado por Burdin *et al* (1995), mas também um real incremento na produção dessa imunoglobulina por linfócitos da mucosa intestinal. Uma depuração hepática ineficiente dos imunocomplexos formados, envolvendo tanto imunoglobulinas M, G e predominantemente A, como proposto, permite, então, deposição glomerular e o agravamento da reação inflamatória.

Contudo, tanto o desenvolvimento da forma hepatoesplênica da esquistossomose como as complicações que têm sido enfatizadas, incluindo o acometimento renal, são também influenciados por fatores raciais e genéticos que modificam ou modulam a resposta imunológica do hospedeiro, predispondo-o ou não às complicações (LAMBERTUCCI *et al*, 2008; NUSSENZVEIG, 2002).

Uma vez definida e após as primeiras manifestações clínicas, a doença renal adquire caráter progressivo autônomo, geralmente conduzindo o paciente para a insuficiência renal crônica, quando não para a morte (BARSOUM, 1999; MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006).

Os achados histológicos têm sido avaliados de modo sistematizado e vários padrões de envolvimento renal são relatados, especialmente nas formas hepatoesplênicas, possivelmente produto da gravidade da doença parasitária e da capacidade do hospedeiro de reagir a ela (ANDRADE; ROCHA, 1979; QUEIROZ; BRITO; MARTINELLI, 1973).

A deposição de imunocomplexos específicos, limitada primariamente à área mesangial, dá ensejo às formas chamadas “mesângio-proliferativas”. Sua expressão clínica é mais discreta e seu curso, admitem alguns, é autolimitado. O acometimento mais difuso do glomérulo, com deposição mais extensa e intensa de imunocomplexos envolvendo não somente o mesângio, mas também a parede capilar e especificamente sua face subendotelial, além de promover forte reação exsudativa, estimula a proliferação das células residentes, em particular as células mesangiais. Um construto teórico da patogenia dessa lesão glomerular, a partir dos dados obtidos nos estudos histopatológicos de biópsias renais, permite propor que essas células, assim ativadas, lancem prolongamentos citoplasmáticos ao longo da parede capilar, fato que estimula podócitos e endotélio à síntese de novos constituintes da membrana basal. Espessada e englobando agora resíduos de células mesangiais, a membrana basal, ao ser tingida por corante exclusivo - a prata metenamina -, dá à parede capilar um aspecto duplicado. Essa forma mais grave de acometimento caracteriza a “Glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo 1” (FIG. 5) (ANDRADE; ROCHA, 1979; BARSOUM, 1993; 1999; MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006). De Brito, Gunji e Camargo (1970) documentaram a transformação da glomerulonefrite mesângio-proliferativa em membrano-proliferativa em pacientes rebiopsiados num intervalo de sete anos. Chama a atenção na literatura a importância que se dá a uma terceira forma de glomerulopatia: a “glomeruloesclerose segmentar e focal” (GESF). Tanto nas formas primárias como nas secundárias à esquistossomose mansônica ou às várias outras doenças, indivíduos da raça negra são os mais acometidos. Do ponto de vista anatomopatológico, as alterações observadas são idênticas às da GESF idiopática ou primária (HOUBA, 1979; NUSSENZVEIG; DE BRITO, 2002;

NUSSENZVEIG *et al*, 2002). À luz do conhecimento atual da fisiopatologia da GESF, pode-se sugerir que essa lesão é uma consequência da redução do número total de néfrons, destruídos pela inflamação prévia, persistente, que gerou os tipos histológicos descritos. Submetidos a mudanças hemodinâmicas importantes que resultam no aumento da hipertensão intracapilar glomerular, os néfrons remanescentes sofrem um processo de esclerose progressiva (ZATZ; FUGIHARA, 2006). A resolução de processos inflamatórios e proliferativos glomerulares, próprios da agressão inicial, pode ainda se processar a partir de cicatrizes segmentares (ZATZ; FUGIHARA, 2006).

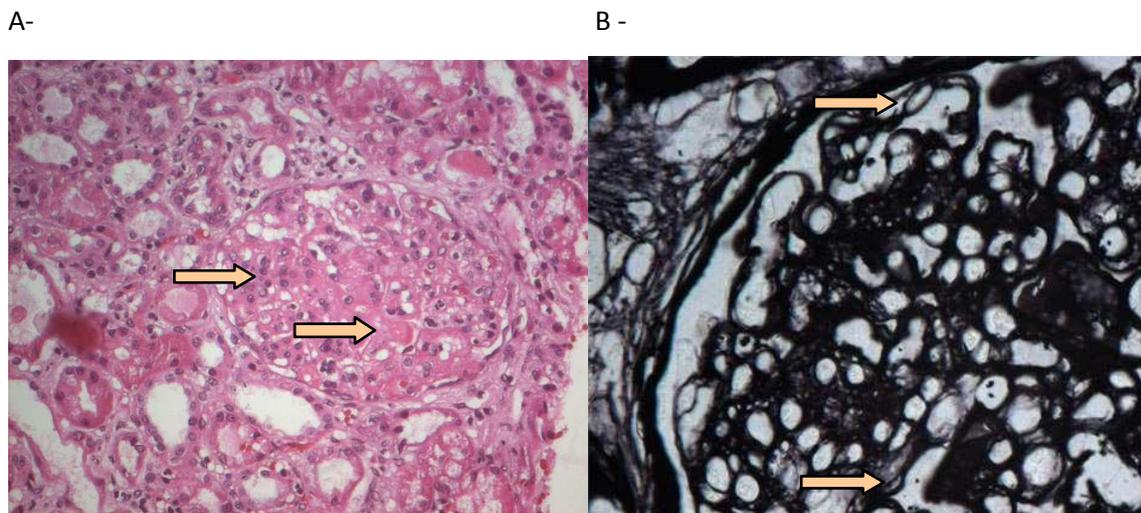


FIGURA 5 - Glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I (hematoxilina-eosina e prata).

A: Intensa proliferação de células mesangiais, expansão da matriz extracelular.

B: Duplo contorno da parede capilar.

Fonte: CTR/DIP SN/FMTM (2008).

Comum a uma série de doenças imunomediadas, a deposição de imunocomplexos estimula a proliferação de células mesangiais, determinando aumento no volume do tufo glomerular (glomerulonefrite mesângio-proliferativa). Ativadas, essas células são capazes de expressar o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) – (MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006), forte indutor da fibrogênese e possível responsável pela transdiferenciação miofibroblástica desse mesmo tipo celular. Essa mudança fenotípica é anunciada, imunohistoquimicamente, pela expressão de alfa actina do citoesqueleto de célula muscular lisa (α SMA), considerada forte marcador de ativação fibroblástica.

Dessa forma, a produção de colágeno intensifica-se e as lesões celulares proliferativas observadas no glomérulo dão lugar a lesões escleróticas. El-Koraie *et al* (2002), compararam

pacientes portadores de nefropatia esquistossomótica com portadores de nefropatias de outras etiologias, mas de características similares. Observaram que os primeiros exibiam mais atividade fenotípica miofibroblástica (α SMA), mais expressão de marcadores de lesão celular (vimentina) e mais atividade proliferativa de células intersticiais e do epitélio tubular, das células inflamatórias quimioatraídas e de miofibroblastos (relação de antígenos nucleares de células em proliferação e marcadores de apoptose). Os miofibroblastos estão diretamente envolvidos na produção de colágeno e na formação de esclerose glomerular em diferentes exemplos de nefropatias progressivas, como a diabética, a obstrutiva, a mediada por imunocomplexos, etc. São grupos heterogêneos de células que expressam actina, vimentina e desmina, isolada ou associadamente. O papel dos miofibroblastos na gênese da esclerose glomerular é consistente com sua ação bem documentada em outras situações associadas à fibrose, como a cirrose hepática, a fibrose pulmonar e a cicatrização de feridas (EL-KORAIE *et al*, 2002). Sua presença mais frequente na nefropatia esquistossomótica pode justificar a ocorrência de glomerulosclerose num momento precoce da lesão renal, quando ainda estão presentes antígenos do *S. mansoni* e imunocomplexos depositados. Essa concomitância é sugestiva, para alguns autores, da relação direta de causalidade entre os antígenos do parasita e as lesões glomeruloescleróticas do hospedeiro.

Numa tentativa de ordenar os achados histopatológicos nos estudos de doença renal, a Associação Africana de Nefrologia propôs, em 1992, um sistema de classificação conhecido como AFRAN (acrônimo para *African Association of Nephrology*) – (BARSOUM, 1993). São propostas cinco classes histológicas da lesão glomerular associadas à esquistossomose, sendo que alguns pacientes podem apresentar variações entre essas classes ao longo do tempo, dependendo, sobretudo, das alterações na doença de base e das comorbidades associadas.

Classe I: Glomerulonefrite mesângio-proliferativa, resultante da deposição de antígenos/anticorpos relacionados.

Classe II: Glomerulonefrite exsudativa. Primeiro descrita por Lambertucci (1984) acomete especificamente pacientes portadores de esquistossomose mansônica e salmonelose associada. Essa entidade foi considerada pelo autor, em publicações posteriores, distinta daquela descrita nos pacientes esquistossomóticos puros (LAMBERTUCCI *et al*, 1987; LAMBERTUCCI,

1988). Em todos os casos estudados, além da infiltração de neutrófilos e macrófagos, havia deposição de proteínas do sistema de complemento e imunocomplexos no mesângio e ao longo da parede capilar glomerular. Antígenos de *S. dublin* e *S. typhimurium* foram encontrados nos depósitos eletrondensos. Após tratamento com cloranfenicol, as alterações imunopatológicas e as manifestações clínicolaboratoriais da glomerulopatia desapareceram a despeito da permanente infecção pelo *S. mansoni*. Esses achados sugeriram efeito direto da *Salmonella* na patogenia da glomerulonefrite observada nesses pacientes.

Classe III: Glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I.

Classe IV: lesões de esclerose glomerular. A ocorrência de glomerulosclerose segmentar e focal como evento primário na esquistossomose mansônica hepatoesplênica é disputada. As classes III e IV constituem a maioria das lesões renais observadas na esquistossomose mansônica complicada por doença hepática. Depósitos de IgA são frequentemente verificados nos glomérulos e no interstício peritubular, como salientado por Barsoum *et al* (1996), contudo, a relevância desse achado é discutível.

Classe V: amiloidose renal - a primeira sugestão da ocorrência de depósito amiloide no parênquima renal de animais infectados com *S. mansoni* veio dos estudos de Sobh *et al* (1991) com modelos de *hamsters*. Nesses animais os autores constataram relação direta entre esse padrão histológico, a carga parasitária, o grau de fibrose hepática e a duração da doença. Barsoum (1999) preconiza que a amiloidose renal que se estabelece no glomérulo renal é consequência da imunossupressão relativa induzida por produtos parasitários agindo sobre macrófagos. Se de um lado a imunestimulação ativa a expressão de proteína sérica AA (sAA), via IL-1 e IL-6, pelo hepatócito, a imunossupressão relativa inibe a atividade fagocitária dos macrófagos, permitindo o acúmulo, a deposição e a adesão dessas proteínas na matriz extracelular, particularmente no ambiente do glomérulo renal.

Uma sexta classe histológica tem sido aventada para contemplar a associação da esquistossomose com infecção pelo vírus da hepatite C. Essa proposição não é consensual e há dúvidas da especificidade das lesões glomerulares correlacionadas a essas infecções associadas (BARSOUM, 2004; MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006; NUSSENZVEIG; DE BRITO, 2002).

A imunofluorescência direta mostra graus variáveis de depósitos de IgG, C3, IgM, e C1q. O sistema do complemento é ativado na sua via clássica e o processo inflamatório glomerular se completa com o recrutamento de células imunologicamente competentes (MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006; SOBH, *et al*, 1987).

A manifestação clínica da doença renal é variável e assintomática em até 35% dos casos, segundo vários autores que trabalharam com material obtido durante cirurgia para esplenectomia (BARSOUM, *et al* 1992; MARTINELLI; BRITO; ROCHA, 1980; ROCHA *et al*, 1976 e SOBH *et al*, 1990).

A maioria dos pacientes, contudo, é vista com síndrome nefrótica. O diagnóstico é assim definido tardiamente, uma vez que a busca pela assistência médica se dá quando os indivíduos observam o surgimento de edemas (ANDRADE; ROCHA, 1979; MARTINELLI; ROCHA, 1996; MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006). A hipertensão é diagnosticada em até 40% dos pacientes à época do diagnóstico da nefropatia e a hipocomplementenemia em mais da metade deles (MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006). Nesse momento, resgata-se a necessidade de estudos que propiciem diagnóstico precoce do acometimento renal da esquistossomose a fim de se propor intervenções renoprotetoras que visam proteger o parênquima renal e amenizem a evolução da doença para a cronicidade.

2.3.2.1 Papel das citocinas na lesão renal

No Diabetes Mellito, tem sido descrito que a infiltração de células do sistema imunológico, em especial macrófagos, está associada à progressão da injúria glomerular (TUTTLE, 2005). Sabe-se que essas células são atraídas para o local lesado por um processo de retroalimentação em que citocinas/quimiocinas produzidas tanto por macrófagos quanto por outras células do sistema imune são responsáveis pela movimentação dos leucócitos para locais de inflamação tecidual a partir da circulação sanguínea (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Diante da evidência de produção alterada de citocinas/quimiocinas na vigência de processos inflamatórios têm sido propostos perfis específicos de citocinas e quimiocinas em pacientes com acometimentos renais (FOUGERAY et al, 2011). Segundo Garin (2000) e Araya (2006) em pacientes com síndrome nefrótica as oscilações dos níveis urinários das quimiocinas podem retratar a evolução da proteinúria e lesão Glomerular.

A despeito de um grande investimento no retardo da evolução da doença renal com intervenções do tipo controle dos picos hiperglicêmicos, controle da hipertensão e utilização de inibidores da enzima conversora angiotensina, percebe-se aumento no número de pacientes com nefropatia diabética (BROSIUS, 2003). Talvez por isso, essa é uma das patologias de base mais estudadas no momento no concernente a perfil imunológico.

Já em 1997, Wolf e colegas sugeriram que a angiotensina II tem um importante papel no recrutamento de monócitos /macrófagos para o tecido renal induzido pelas quimiocinas RANTES/CCL5 e MCP-1/CCL2, demonstrando possível envolvimento dessas quimiocinas com a resposta inflamatória na lesão renal diabética. No ano seguinte, 1998, e em 2003 essas mesmas quimiocinas foram encontradas em quantidade elevada no rim de pacientes portadores de doenças glomerulares progressivas, rejeição a transplantes e nefrite intersticial em estudos realizados por Mukaida, Harada e Matsushima (1998) e Segerer (2003), reforçando mais uma vez a teoria de que estão diretamente envolvidas na lesão glomerular.

Amann; Tinzmann e Angelkort (2003) demonstraram que ao bloquearem o sistema renina angiotensina, havia diminuição dos níveis de MCP-1/CCL2 urinária e conseqüente melhora da evolução da nefropatia diabética. Em 2011, Urushihara e colegas demonstraram em experimento animal que a aplicação de terapêutica combinada de inibição do receptor de MCP-1/CCL2 e da inibição de receptores de angiotensina II pode ser o caminho para redução a lesão renal nas nefrites.

No ano de 2000, em importante estudo desenvolvido por Wada e cols foram demonstrados níveis de MCP-1/CCL2 urinários significativamente aumentados em pacientes com nefropatia diabética, além de correlação positiva para infiltração de macrófago no interstício renal, sugerindo nesse caso, que MCP-1/CCL2 também teria participação direta com o recrutamento de macrófago para o tecido renal. Embora experimentos para avaliar a possível regulação do fluxo de células inflamatórias para os rins em diabéticos estejam incompletos, esses achados sugerem que a administração de anticorpos anti MCP-1/CCL2 poderia prevenir a esclerose glomerular e fibrose intersticial.

Tuttle (2005), após analisar dois importantes estudos desenvolvidos por Kelly e colaboradores (2005) e Chow e colaboradores (2005), registra que a nefropatia diabética pode ser vista como doença inflamatória que provoca desordem metabólica e ainda que, intervir nesses processos inflamatórios terapeuticamente (antioxidantes, inibidores de macrófagos entre outros) pode ser a solução para o controle efetivo da evolução da lesão renal em pacientes portadores da diabete.

Galkina e Ley (2006) contribuíram para a edificação do conceito da nefropatia diabética como processo inflamatório. Relataram que macrófagos nos tecidos renais, células T e neutrófilos produzindo várias espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento modulam a resposta imunológica local, além de aumentar a inflamação no desenvolvimento da nefropatia diabética. Estes autores sugeriram ainda que as moléculas de adesão intercelular -1 (ICAM-1) e quimiocinas, em especial a MCP-1/CCL2, estão diretamente envolvidas com o processo de recrutamento de macrófagos nas lesões renais

inflamatórias. O acúmulo dessas células no parênquima renal pode induzir a proteinúria e proliferação mesangial durante o desenvolvimento da nefropatia diabética. Em estudos anteriores, Okada e colaboradores (2003) já haviam registrado melhora da injúria renal diabética retratada pela diminuição da albuminúria, da hipertrofia glomerular e da expansão da matriz mesangial quando observaram ratos com deficiência de ICAM-1.

Em 2008 três trabalhos foram enfáticos na afirmação da participação da quimiocina MCP-1/CCL2 no processo inflamatório de lesão renal. No estudo de Ibrahim e Rashed (2008) foi reportado aumento estatisticamente significativo de MCP-1/CCL2 urinária de pacientes portadores de nefropatia diabética (ND) que apresentavam micro e macroalbuminúria quando comparado com os pacientes também portadores de ND, porém, com normoalbuminúria, ou ainda, quando comparados com controles saudáveis. Nesse estudo foi destaque o envolvimento de MCP-1/CCL2 com a fisiopatologia da lesão renal na ND em vários estágios da doença. Tesch (2008) sugeriu que a produção de MCP-1/CCL2 pelos rins de pacientes diabéticos bem como os níveis urinários de MCP-1/CCL2 desses mesmos pacientes podem ser utilizados para avaliar a inflamação renal na doença. Ainda nesse mesmo ano Wolkow e colaboradores (2008) avaliaram a relação entre a diminuição da função renal e a elevação dos níveis urinários de IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, IL-6, IP-10 e MIP-1 δ . Os resultados mostraram que os níveis urinários dos cinco mediadores inflamatórios estavam mais elevados no grupo de pacientes que mostravam declínio da função renal, sugerindo que o processo inflamatório no rim contribui para progressão da nefropatia diabética.

Outra quimiocina de interesse no estudo da fisiopatologia das lesões renais é a interleucina-8 (IL-8/CXCL8), um peptídeo produzido por células endoteliais e macrófagos, que tem a função de atrair neutrófilos e linfócitos para o tecido inflamado (QI et al, 2006; MUKAIDA; HARADA; MATSUSHIMA, 1998). Embora ainda controverso muitos estudos têm mostrado a elevação dos níveis séricos e urinários de IL-8/CXCL8 durante episódios de recidiva da síndrome nefrótica (VAN DEN BERG; WEENING, 2004; ARAYA et al, 2006; CHO et al, 2003), sugerindo envolvimento dessa quimiocina na indução de proteinúria. O trabalho desenvolvido por Tashiro e colaboradores em 2002 descreveu níveis aumentados de IL-8/CXCL8 urinária em estágios iniciais da nefropatia diabética. Ao contrário dos resultados

acima descritos, em trabalho publicado por Rovin e colaboradores em 2005, no qual avaliaram os níveis urinários de MCP-1/CCL2 e IL8/CXCL8 em pacientes portadores de lupo eritematoso sistêmico (LES) com e sem lesão renal agudizados e comparou com indivíduos com LES controlado e ainda com indivíduos saudáveis, os níveis de IL8/CXCL8 não se alteraram nos pacientes LES em atividade e também não se alteraram quando comparados entre os pacientes com e sem doença renal e àqueles com doença controlada. Salienta-se que esse mesmo estudo mostrou que a MCP-1/CCL2 estava muito aumentada na urina daqueles indivíduos com lesão renal e em fase aguda do LES em comparação com aqueles com a doença controlada e com os indivíduos saudáveis. Constatou-se correlação positiva entre MCP-1/CCL2 urinária e proteinúria de fase aguda, observando níveis ainda maiores com a presença de glomerulonefrite proliferativa naqueles com lesão renal já constatada. E o achado mais confirmatório do envolvimento da MCP-1/CCL2 com a lesão renal: aqueles pacientes que responderam a terapêutica de controle da lesão renal apresentaram níveis reduzidos da MCP-1/CCL2 em poucos meses, já aqueles não responsivos mantiveram níveis persistentemente altos desta quimiocina.

A MIP-1 α /CCL3, quimiocina produzida por macrófagos, que participa ativamente da inflamação, foi descrita como importante mediador de resposta imune produzida substancialmente por macrófagos infiltrados na região glomerular, em vários tipos de glomerulonefrites (COCKWELL; HOWHI; SAVAGE, 1998). Além disso, em trabalho publicado por Souza e colaboradores (2005) observou-se que a MIP-1 α /CCL3 é marcadora de gravidade da esquistossomose em humanos e em animais.

A quimiocina eotaxina, uma citocina pró-inflamatória, é citada em alguns trabalhos como mediador imunológico nos processos de resposta à presença da esquistossomose ou mesmo aumentada na possibilidade de acometimento de tecidos renais (SOUSA-PEREIRA et al, 2006; CHERNEY et al, 2011).

Não há estudos sobre o papel das quimiocinas na resposta imunológica às agressões renais, na nefropatia esquistossomótica. Seria desejável investigar o perfil das quimiocinas em pacientes com glomerulonefrite observada na esquistossomose hepatoesplênica.

2.4. Efeito do tratamento da parasitose na evolução da nefropatia associada

Entendendo que a glomerulonefrite associada à esquistossomose mansônica é uma doença imunologicamente mediada, era esperado que a quiescência do processo mediador, seguindo-se ao tratamento da parasitose, revertesse as lesões histológicas e clínicas, interrompendo sua evolução.

Sabe-se, contudo, que a doença renal tem evolução protraída e subclínica, amplamente atestada por De Brito *et al* (1969), Rocha, Cruz e Brito (1976) e Silva *et al* (1970) ao descreverem lesões histopatológicas e imunodépósitos mesangiais em pacientes ainda sem alterações urinárias. Martinelli *et al* (1979), a partir de estudos em pacientes hospitalizados, salientaram também a evolução lenta da nefropatia. O fato de a erradicação da parasitose não modificar a evolução da glomerulopatia esquistossomótica pode ser consequência de uma intervenção tardia, tempos após uma agressão renal persistente e prolongada ter produzido não somente lesões glomerulares extensas, mas, principalmente, a destruição de um número significativo de unidades nefrônicas. A partir de então, os eventos imunológicos iniciais produzidos pelo parasita já não mais importam e outros mecanismos de agressão ao glomérulo dão o caráter progressivo da doença (MARTINELLI; PEREIRA; ROCHA, 1987; SOBH *et al*, 1988b; 1989; 1993).

Ao estudarem fatores prognósticos em 42 pacientes com glomerulopatia esquistossomótica, Martinelli, Silveira e Rocha (2006) mostraram que a forma histológica tem implicações consideráveis. Na sua população, o curso clínico foi menos favorável e o desenvolvimento de insuficiência renal crônica mais frequente naqueles com diagnóstico de glomerulonefrite membrano-proliferativa. À análise multivariada, a hipertensão arterial e a insuficiência renal, já ao primodiagnóstico, correlacionaram-se com a progressão da nefropatia, independentemente do diagnóstico histopatológico.

O tratamento da nefropatia esquistossomótica em estágio terminal por meio de transplante renal não tem sido avaliado de forma sistemática, havendo poucas publicações, a maioria sendo de relatos de casos. Azevedo *et al.* (1987) salientaram a evolução pós-transplante de quatro pacientes com diagnóstico provável de nefropatia esquistossomótica e a possibilidade de recorrência da doença renal. O impacto das alterações do sistema imune descrito no paciente esquistossomótico sobre os resultados do transplante renal não está devidamente esclarecido. Mahmoud *et al* (2001), analisando a evolução de pacientes portadores de *S. mansoni* e *S. hematobium* submetidos ao transplante renal e acompanhados por um período de 10 anos, não detectaram diferenças na incidência de episódios de rejeição aguda e de nefropatia crônica do enxerto quando os resultados foram comparados àqueles obtidos de pacientes transplantados não-esquistossomóticos. Sobh *et al* (1992), investigando resultados de transplante renal em egípcios, não encontraram diferenças significativas nas incidências de rejeições aguda ou crônica entre grupos de pacientes esquistossomóticos e não-esquistossomóticos. Relataram, contudo, complicações pós-operatórias mais frequentemente no grupo de pacientes infectados (infecção do trato urinário, estenose ureteral, fístulas urinárias, nefrolitíase, antigenemia pelo vírus da hepatite B e alterações nas doses de ciclosporina), concluindo que a esquistossomose pode afetar a evolução do transplante renal. É necessário enfatizar que a população de receptores de rim estudada, 128 pacientes, era infectada por *S. haematobium* (13,3%), *S. mansoni* (45,3%) ou ambos (41,4%), fato não estudado com o devido cuidado.

Em suma, os dados disponíveis na literatura sugerindo não haver diferenças estatísticas na evolução e na sobrevida do enxerto renal entre pacientes transplantados renais infectados ou não pelo *S. mansoni* asseguram também essa opção terapêutica (MAHMOUD *et al*, 2001).

2.5 Considerações finais

A evolução patogênica da glomerulonefrite esquistossomótica não é assunto consensual na literatura, mas a maioria dos autores admite a seguinte sequência de eventos:

Antígenos oriundos do intestino do verme adulto estimulam o sistema imune do hospedeiro cuja resposta anticorpo-específico faz surgir imunocomplexos circulantes (ICC) ou formados no próprio tecido renal (*in situ*). A depuração hepática desses imunocomplexos está comprometida tanto pela fibrose tecidual instalada como por uma atividade fagocitária reduzida das células de Kupffer ou ainda pela presença de colaterais porta-sistêmicas, facilitando sua deposição no tecido renal (BARSOUM, 1999).

Obedecendo a características próprias da estrutura glomerular, os depósitos iniciais de IC circulantes se fazem predominantemente no mesângio. Isso se dá porque não há outra barreira ao trânsito de ICC do lúmen capilar ao mesângio que não o endotélio, com suas fenestrações de 70 Å, em média. A deposição de ICC estimula produção de quimiocinas, em especial na glomerulopatia diabética, a MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, IL-8/CXCL8, e o recrutamento de células envolvidas com a resposta imune que por sua vez estimulam as células mesangiais à síntese de matriz extracelular (aumentando a área mesangial por depósito de macromoléculas) e à proliferação cujo objetivo final é a degradação dessas moléculas complexadas: se a deposição é contínua e intensa, também o é o estímulo para tais alterações histológicas e a desfiguração do glomérulo se intensifica, culminando numa reação inflamatória mais difusa e intensa (ZATZ; FUGIHARA, 2006). Os ICCs surgem também depositados ao longo da parede capilar, predominantemente no espaço subendotelial, já que a membrana basal os impede, pelo seu tamanho e características físicas, de ganhar o espaço subepitelial. As células mesangiais ativadas e em proliferação emitem prolongamentos citoplasmáticos que invadem a parede capilar, interpondo-se entre estruturas celulares e a membrana basal. Esse movimento estimula células podocitárias e endoteliais a sintetizarem uma neomembrana basal que, quando corada pela prata, faz surgir o aspecto característico de “duplo contorno” ou “*tram track*”, termo proposto por patologistas americanos. Essa sequência de eventos não é patognomônica da glomerulopatia esquistossomótica, mas comum a um elevado número de glomerulopatias mediadas por ICC (ZATZ; FUGIHARA, 2006).

As outras formas histológicas já descritas não se mostraram consistentes e as relações de causalidade não foram estabelecidas de modo formal (estudos imunoeletrônicos e estudos do imunocomplexo específico pelas técnicas de eluição, por exemplo). A existência de

antígenos CCA/CAA no tecido renal pode caracterizar a deposição passiva de antigenemia crônica, irrelevante patogeneticamente (*non immunological trapping*), uma vez que o verme pode sobreviver no hospedeiro humano por longos períodos de tempo (15–20 anos).

Essa deposição está facilitada se o tecido renal já estiver lesado por qualquer outro motivo, gerando, assim, interpretações inadequadas. A descrição de depósitos amilóides e de imunofluorescência direta positiva predominante de IgA, por pesquisadores egípcios, não se confirmou na casuística de autores nacionais. Esses dados sugerem a existência de diferenças geográficas ou étnicas no desenvolvimento da nefropatia secundária à esquistossomose mansônica (CHUGH; SAKHUJA, 1998; NUSSENZVEIG *et al*, 2002).

Mesmo diante de alguns desencontros de informações publicadas a respeito de todos os processos que envolvem a lesão renal esquistossomótica pode-se dizer que há concordância na definição da lesão, ou seja, basicamente glomerular e inflamatória. Porém não há qualquer citação na literatura atual de um possível perfil de mediadores inflamatórios que pudessem indicar o diagnóstico da lesão glomerular precocemente, antes mesmo das manifestações clínicas em pacientes com glomerulopatia esquistossomótica.

2. METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo transversal observacional e comparativo cuja coleta de dados ocorreu entre outubro de 2008 e julho de 2010. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar e submeteram-se à anamnese, exame físico e exames laboratoriais.

O projeto foi avaliado e aprovado pelos comitês de Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG parecer 368/08 e do Hospital São João de Deus/Divinópolis parecer 113/2010.

3.2 Cálculo da amostra

Não há dados na literatura para cálculo amostral com relação aos aspectos imunológicos relativos aos níveis de quimiocinas em pacientes com esquistossomose e lesão renal. Para tanto se realizou estudo piloto que permitiu calcular o número de pacientes necessário para se obter significância estatística do estudo.

3.3 Estudo piloto

Foram selecionados 18 pacientes com o diagnóstico de esquistossomose hepatoesplênica (EHE) com média de idade de $45,5 \pm 11$ anos e 21 voluntários aparentemente saudáveis (VS) com idade média de 40 ± 10 anos. Os pacientes portadores de EHE submeteram-se a propedêutica clínico-laboratorial. Em ambos os grupos, realizaram-se em amostra de urina de 24 horas, os exames de microalbuminúria e mensuração das seguintes citocinas: IL-8/CXCL8, IP-10, MCP-1/CCL2, MIP-1- α /CCL3, RANTES/CCL5 e eotaxina-2/CCL24. Os resultados

revelaram que os vinte um voluntários aparentemente saudáveis (grupo VS) não apresentavam microalbuminúria ($\leq 30\text{mg}/24\text{horas}$). Quinze, dos 18 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica apresentaram microalbuminúria $\leq 30\text{mg}/24\text{horas}$ (grupo EHE s/LR) e três pacientes com esquistossomose hepatoesplênica apresentaram lesão renal ($>30\text{mg}/24\text{horas}$) (grupo EHE c/LR). As citocinas RANTES/CCL5, IL-8/CXCL8 e MCP-1/CCL2 apresentaram níveis significativamente mais altos no grupo EHE c/LR, sendo $p < 0,000$, $p < 0,000$ e $p < 0,018$, respectivamente, encontrados quando comparados com o grupo VS e grupo EHE s/LR. A eotaxina-2/CCL24 ($p < 0,009$) apresentou diferença significativa, quando se compararam os três grupos, porém, os seus valores foram menores no grupo EHE c/LR. As citocinas IP-10/CXCL10 e MIP-1 α /CCL3 não mostraram diferença estatística quando comparadas entre os 3 grupos. A partir dos resultados encontrados constatou-se que os pacientes do grupo EHE c/LR possuíam os níveis urinários das citocinas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 mais elevados e eotaxina-2 com nível urinário mais baixo quando comparados com os grupos EHE s/LR e VS.

Esses resultados do estudo piloto permitiram calcular a amostra com o poder de 80% e significância de 5%. Para 120 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal (microalbuminúria $\leq 30\text{mg}/24\text{horas}$) necessitava-se de cinco pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com microalbuminúria $>30\text{mg}/24\text{horas}$. Neste estudo optou-se por trabalhar com pelo menos dois controles para cada caso, sendo que apenas um grupo (pacientes com glomerulopatia sem esquistossomose), ficou com a equivalência de um caso para 1,75 controles (SCHLESSELMAN; STOLLEY, 1982).

3.4 População estudada

Pacientes com EHE e lesão renal foram comparados com os seguintes grupos: esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal, esquistossomose hepatointestinal, glomerulopatias de outras etiologias e indivíduos aparentemente saudáveis. Os indivíduos aparentemente saudáveis (pesquisadores e colaboradores) aceitaram participar do estudo após convite da pesquisadora. Os outros grupos foram selecionados no momento das consultas

consecutivas de rotina em ambulatório. A admissão dos pacientes no estudo foi interrompida quando o número de indivíduos atingiu o cálculo amostral.

3.4.1 Os grupos:

3.4.1.1 Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal (EHE s/LR): foram selecionados 68 pacientes adultos com esquistossomose mansônica hepatoesplênica, sem lesão renal (microalbuminúria $\leq 30\text{mg}/24\text{horas}$). Todos eram atendidos regularmente no ambulatório de Doenças Infecciosas da Unidade Funcional Orestes Diniz do Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR/DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG).

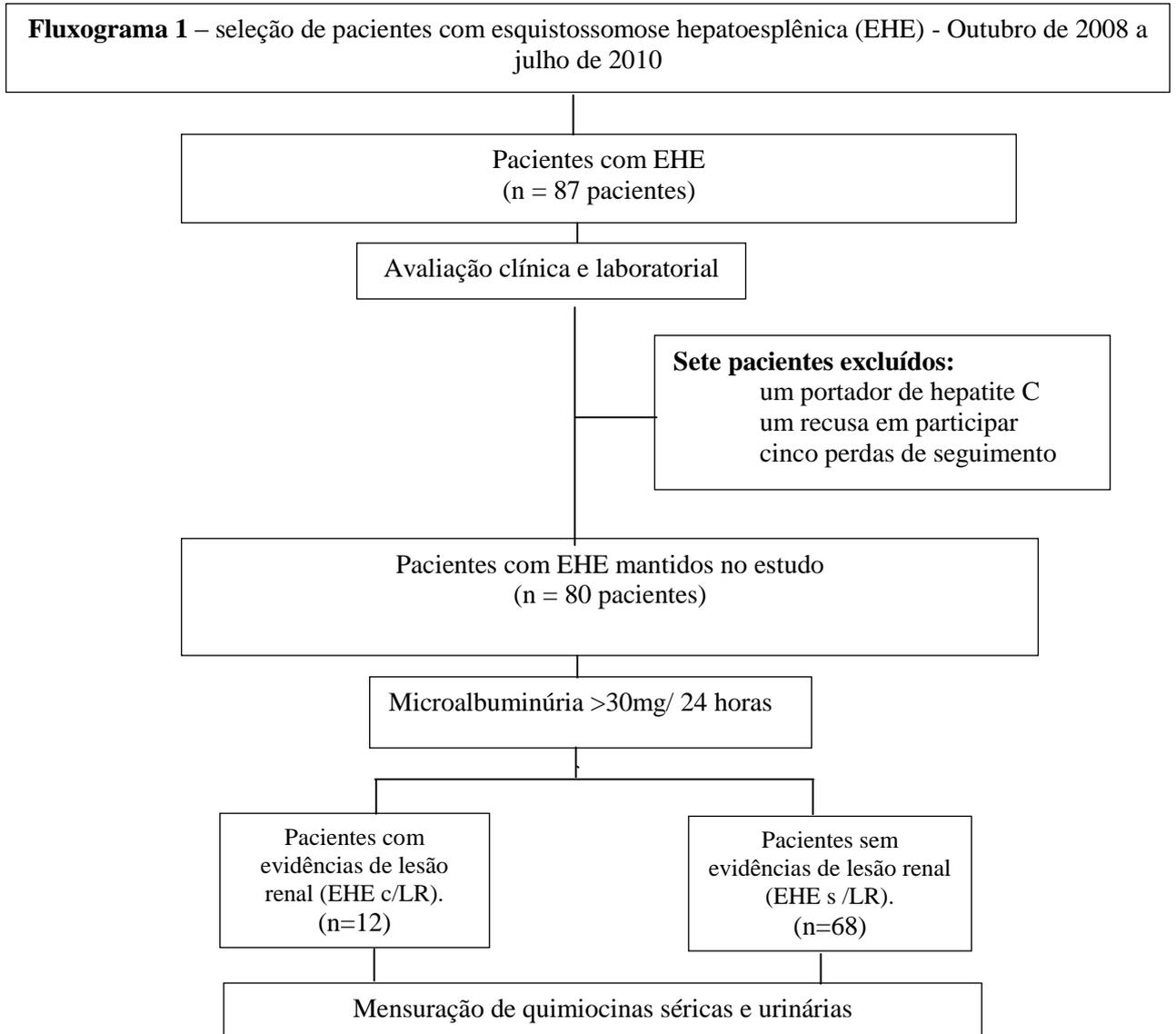
Os pacientes atendidos a partir de outubro de 2008 até julho 2010 já tinham diagnóstico prévio de EHE definido de acordo com os critérios do serviço DIP, ou seja, história de convivência em área endêmica de esquistossomose e tratamento para a doença, sem ovos viáveis de *S. mansoni* nas fezes, achados ultrassonográficos de fibrose hepática periportal, varizes gastroesofagianas e hepatoesplenomegalia. Não havia evidências de doença renal em 68 pacientes com EHE [sem proteinúria, sem alterações da função excretora renal avaliada a partir do cálculo do ritmo de filtração glomerular (RFG) empregando-se a fórmula proposta por Levey et al (1999), no estudo "Modification of Diet in Renal Disease" – MDRD, numa versão simplificada: $\text{RFG} = 186(\text{Creatinina sérica})^{-1,154} (\text{Idade})^{-0,203} \text{ mL/m}/1,73\text{m}^2$, multiplicando-se o resultado por 0,742 se paciente do sexo feminino. A concentração da creatinina usada na fórmula foi medida por método colorimétrico].

Ao término da consulta clínica, os pacientes foram instruídos sobre a coleta de urina de 24 horas. No momento da entrega da urina retirou-se amostra para análise das quimiocinas elencadas para o estudo. Na ocasião, coletou-se amostra de sangue para avaliação dos níveis séricos das quimiocinas. Todas as amostras foram obtidas com material estéril e descartável,

centrifugadas, sendo o sobrenadante da urina e o soro acondicionadas em tubos Ependorf e congeladas a -80°C até o momento do experimento.

Para serem incluídos no grupo EHE s/LR, após lerem e assinarem o TCLE, os pacientes não podiam ter o diagnóstico das seguintes doenças já investigadas anteriormente: leishmaniose visceral; infecção pelos vírus da hepatite B ou C, HIV; diabetes melito; doenças autoimunes (lupo eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, hepatite autoimune); anemia falciforme; crioglobulinemia primária; púrpura de Henoch-Schönlein; abscessos viscerais e neoplasias.

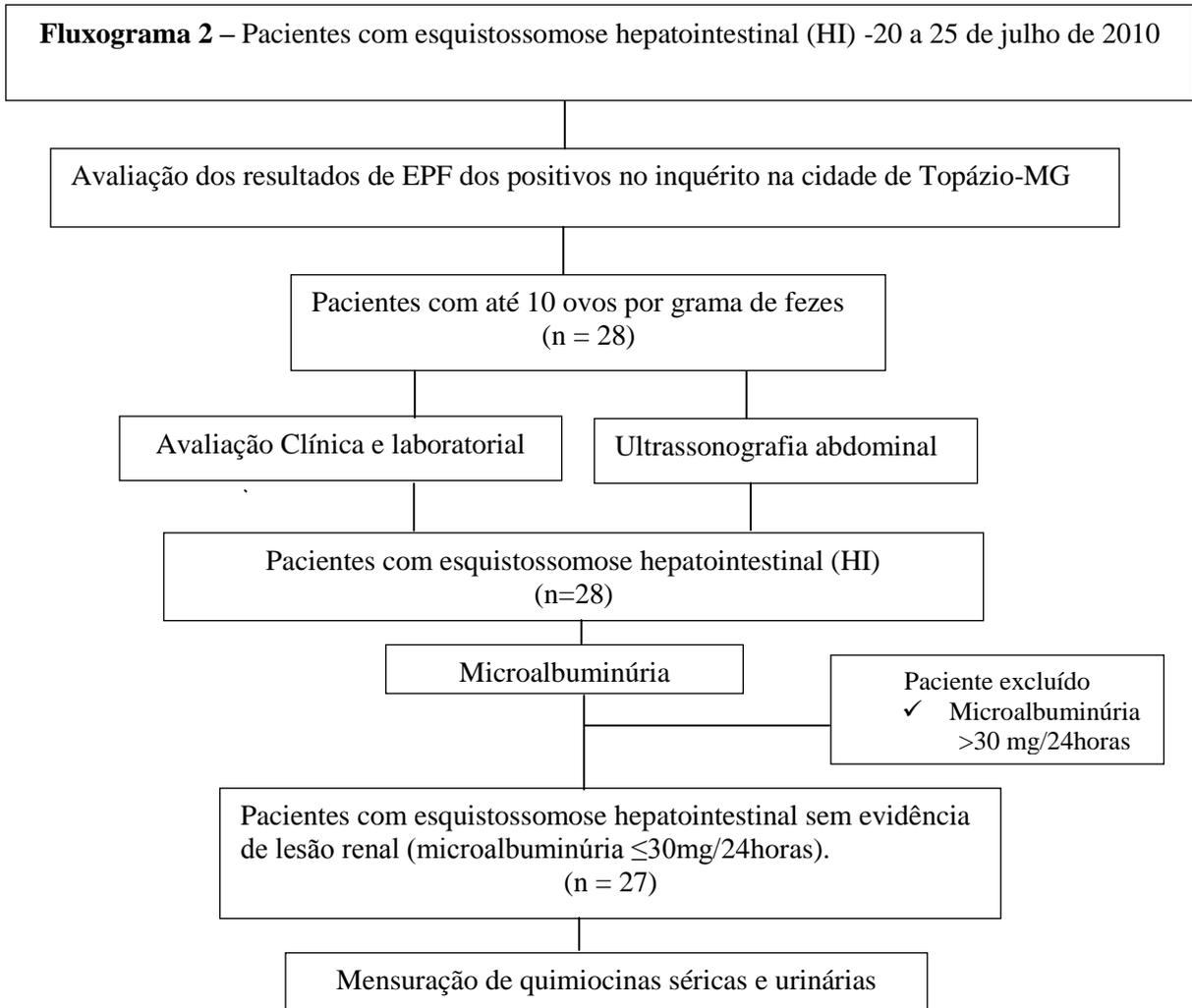
3.4.1.2 Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal (EHE c\LR): selecionaram-se 12 pacientes adultos com EHE e lesão renal (microalbuminúria $>30\text{mg}/24\text{horas}$). Eles submeteram-se a propedêutica clínico-laboratorial para excluir causas secundárias de glomerulopatias [exames: C3 e C4, anticorpo antiestreptolisina O (nefelometria), fator antinuclear (FAN) e anticorpos anticitoplasma de neutrófilos de distribuição perinuclear (ANCAp) e citoplasmática (ANCAc) por imunofluorescência indireta, fator reumatóide, crioglobulina, eletroforese de proteínas séricas, vírus das hepatites B e C (Elisa), glicose em jejum, níveis séricos da imunoglobulina A]. De 12 pacientes que compunham esse grupo oito tinham biópsia renal prévia com os seguintes diagnósticos: glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I (quatro); glomerulonefrite mesângio-proliferativa com esclerose segmentar (um); glomerulonefrite mesangial com depósitos de IgA (um); glomerulonefrite mesangial com esclerose segmentar (um) e glomerulonefrite mesangial (um). Esses pacientes também eram atendidos regularmente no ambulatório CTR/DIP - HC-UFG. Para este grupo os procedimentos diagnósticos foram iguais aos do grupo anterior.



FLUXOGRAMA 1– seleção de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com e sem lesão renal - Outubro de 2008 a julho de 2010.

3.4.1.3 Esquistossomose hepatointestinal (HI): selecionaram-se 27 pacientes adultos com esquistossomose hepatointestinal sem lesão renal (microalbuminúria ≤ 30 mg/24horas), moradores do município de Topázio – MG, atendidos em trabalho de campo pela mesma equipe de pesquisadores. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde/MG a prevalência da esquistossomose na cidade Topázio - MG em 2010 foi de 20%. Os pacientes com até 10 ovos por grama de fezes de *S. mansoni* foram convidados a participar do estudo. Pacientes com carga alta > 10 ovos por grama de fezes tem uma chance maior de desenvolver a forma

hepatoesplênica. Eles assinaram o termo de compromisso livre e esclarecido (TCLE). Ao exame clínico e ultrassonográfico não apresentavam esplenomegalia, colaterais portais ou fibrose hepática periportal. Para este grupo os procedimentos diagnósticos foram iguais aos dos grupos anteriores.

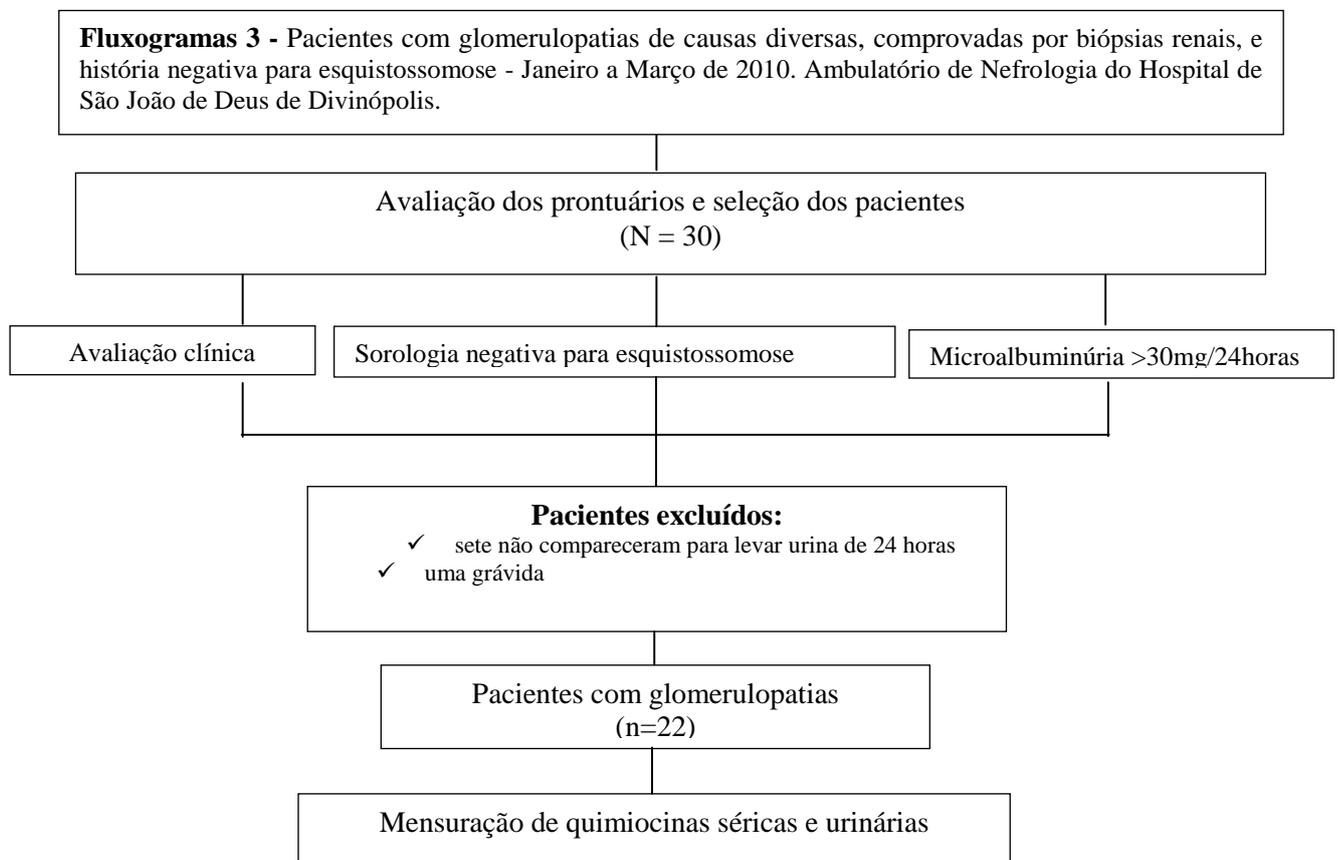


FLUXOGRAMA 2 – Pacientes com esquistossomose hepatointestinal sem lesão renal - 20 a 25 de julho de 2010

3.4.1.4 Glomerulopatia sem esquistossomose (GN s\E): selecionaram-se 22 pacientes adultos com glomerulopatias de outras causas, todos em uso de inibidores de enzima conversora da angiotensina: glomerulonefrite lúpica (duas), glomerulonefrite membranosa (uma), glomerulonefrite por IgA (duas), glomeruloesclerose segmentar e focal (sete), glomerulonefrite diabética (uma), lesões mínimas (uma) e glomerulopatia mesangial idiopática (seis), glomerulonefrite proliferativa difusa (duas), confirmadas por biópsia renal e

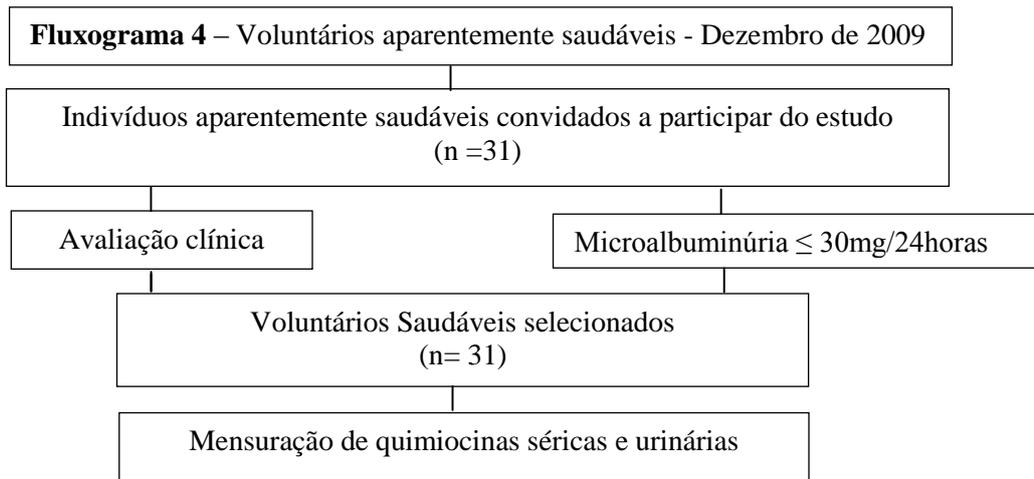
sorologia negativa para esquistossomose, atendidos em ambulatório do Hospital São João de Deus em Divinópolis/MG.

Para este grupo os procedimentos diagnósticos foram semelhantes aos dos grupos anteriores, com acréscimo de uma amostra de plasma para realização da pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos de *S. mansoni* (SWAP).



FLUXOGRAMA 3 - Pacientes com glomerulopatias por diversas causas comprovadas por biópsias renais e história e sorologias negativas para esquistossomose - Janeiro a Março de 2010.

3.4.1.5 Voluntários saudáveis (VS): foram selecionados 31 voluntários adultos de ambos os sexos, mediana de idade 40 anos (40 ± 23) (pesquisadores e colaboradores) aparentemente saudáveis que após lerem e assinarem o TCLE se dispuseram a participar do estudo, sem história prévia de esquistossomose.



FLUXOGRAMA 4 – Voluntários aparentemente saudáveis - Dezembro de 2009

3.5 Métodos

3.5.1 Exame físico

O exame físico foi realizado pelo grupo de pesquisadores com aferição de peso, altura, pressão arterial e frequência cardíaca. Palpou-se o abdome com o paciente em decúbito dorsal em respiração espontânea. O fígado e o baço foram classificados como “palpável” ou “não palpável”. Circulação colateral na parede abdominal e estigmas de insuficiência hepática (ginecomastia, aranhas vasculares, telangiectasias), assim como sinais de insuficiência cardíaca (desvio do *ictus cordis*, bulhas acessórias, sopros, crepitações pulmonares, edema periférico) foram investigados.

3.5.2 Ultrassonografia

O exame ultrassonográfico do abdome foi realizado utilizando-se o aparelho portátil ALOKA SSD 1700 Dynaview (ALOKA, Japão) com transdutores convexos eletrônicos de 3,5 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 (WHO, 2000)

3.5.3 Os exames de microalbuminúria

Os exames foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram feitos conforme os ensaios propostos, seguindo rotina daquele setor. Na urina coletada num período de 24 horas, mantida num ambiente arejado e fresco, quantificou-se a proteinúria: se o teste qualitativo fosse positivo, empregava-se o ácido sulfosalicílico; se negativo, utilizava-se o teste imunoenzimático. Albuminúria superior a 30 mg/24horas foi considerada anormal. Os exames de microalbuminúria realizados no laboratório Municipal de Teófilo Otoni e no laboratório do Hospital São João de Deus em Divinópolis mantiveram o padrão de técnicas semelhantes ao do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5.4 Exames das quimiocinas urinárias e séricas

Para o ensaio de quimiocinas as amostras de soro foram descongeladas e o excesso de proteínas foi removido por precipitação sal/ácida, seguiram a rotina padrão do laboratório (MOREIRA, 2006; CHRISTO et al, 2009). Em síntese, volumes equivalentes de soro e 1,2 % de ácido trifluoracético\1,35 M NaCl foram misturados e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3.000 rotações por minuto e o sobrenadante foi ajustado para o conteúdo de sal (0,14M Cloreto de Sódio e 0,01 M de fosfato de sódio) e pH (7,4) para determinação dos níveis de quimiocinas. A concentração das quimiocinas foi medida de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante e usado kits de ELISA sanduíche Proteína quimiotática de macrófago 1 MCP-1/CCL2 eotaxina/CCL11, Proteína Inflamatória Macrófago -1 α (MIP - 1 α /CCL3), Interleucina -8 (IL-8/CXCL8) e RANTES/CCL5 (CCL5)(Duoset, R&D Systems, Minneapolis, Minn.,USA). A detecção limite para ensaio foi de 10 picogramas por mililitro (pg/ml). A técnica para mensuração da concentração de quimiocinas na urina foi idêntica a do soro, porém, não se fez o processo de equilíbrio ácido básico descrito no soro. Esse processo somente é realizado em líquidos que contém excesso de proteínas, o que não acontece na urina.

3.5.5 Exame de Fezes

A presença e a intensidade de infecção foram determinadas através da presença e da contagem do número de ovos do parasita por grama de fezes (epg), obtidos através do método de Kato-Katz (Katz et al, 1972). Para os casos dos pacientes com esquistossomose hepatointestinais os exames parasitológicos de fezes foram realizados antes da coleta de sangue e anteriormente à administração de quimioterápicos, sendo que todos os indivíduos portadores da infecção foram tratados com praziquantel, independentes de sua participação, ou não, neste estudo.

3.5.6 Detecção dos níveis de anticorpos específicos contra antígenos de *S. mansoni* (SWAP)

O antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) foi preparado com o sobrenadante solúvel em tampão salino, de acordo com a metodologia descrita por Hirsch e colaboradores em 1996. Os níveis de anticorpos específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) foram determinados no plasma através de ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (HIRSCH, C., GOES, A.M., 1996).

3.6 Análise estatística

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados eletrônico utilizando o software EpiData 3.1 [Lauristen JM. (editor) EpiData Entry, Data Management and basic Statistical Analysis System. Odense Denmark, EpiData Association, 2000-2006 (<http://www.epidata.dk>)]. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* SPSS 15.0 for Windows (SPSS Incorporated, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América, 2006).

3.6.1 Análises descritivas

Foi realizada análise descritiva das variáveis coletadas a fim de caracterizar a amostra. Para as variáveis categóricas foram empregadas tabelas de distribuição de frequência. Para as variáveis contínuas foram adotadas medidas de tendência central e variabilidade. Optou-se por utilizar como medida de tendência central a mediana e intervalo interquartil como medida de variabilidade pelo fato das variáveis contínuas analisadas não apresentarem distribuição normal (Shapiro-Wilk).

3.6.2 Análise univariada

Cinco grupos foram comparados: EHE s\LR, EHE c\LR, HI, GN s\ E e VS. Na comparação desses grupos foram utilizados os testes qui-quadrado de Pearson e exato de Fischer para as variáveis categóricas e Kruskal-Wallis para as contínuas. Considerou-se nível de significância de 5%. Para a comparação múltipla das variáveis contínuas utilizou-se o teste Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

3.6.3 Análise multivariada

3.6.3.1 Regressão logística

Na análise multivariada para investigação dos fatores associados aos grupos de estudo optou-se inicialmente por utilizar um modelo de regressão logística, considerando como desfecho a ocorrência de doença renal em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (HOSMER; LEMESHOW, 2000). Entretanto, devido à multicolinearidade entre as variáveis explicativas inseridas no modelo, as estimativas não apresentaram boa convergência e nenhum modelo

adequado de regressão logística foi encontrado. Optou-se por um segundo tipo de análise multivariada, conforme descrito abaixo

3.6.3.2 *Árvore de decisão*

Este é um modelo com estrutura em forma de árvore que usa o raciocínio indutivo para classificar todos os dados de entrada. É um modelo de regressão não paramétrico e preditivo (MITCHELL, 1997; WITTEN et al, 2005; THEODORIDIS; KOATROUMBAS et al , 2006).

Por se tratar de um método não paramétrico, a árvore de decisão permite que sejam analisados pequenos conjuntos de dados, bem como um conjunto de variáveis explicativas fortemente correlacionadas, como é o caso das variáveis avaliadas neste estudo. Ainda permite a identificação de subgrupos homogêneos pela comparação sistemática de suas características, estabelecendo relação entre um vetor de variáveis explicativas/preditoras, que nesse estudo são as quimiocinas, *versus* a variável resposta, aqui considerada como cada um dos cinco grupos de estudo. Os nomes mais descritivos de tais modelos de árvores são a árvore de classificação (resultado discreto) ou árvore de regressão (resultado contínuo), sendo esse o algoritmo CART (Classification and Regression Tree – Árvore de Classificação e Regressão) utilizado na análise do estudo em questão (BELL, 1996; FERREIRA; SOARES; CRUZ, 2001).

Na análise pelo algoritmo CART, o critério de exclusão das variáveis do modelo é uma medida denominada *improvement* (melhora), que avalia o grau de “impureza” que foi eliminada do modelo com o acréscimo de novas variáveis. Quanto maior o valor do *improvement*, maior a importância das variáveis na classificação e, conseqüentemente, mais homogêneos serão os novos nós. Nessa análise, foi utilizado como critério de interrupção um *improvement* mínimo de 0,01 (BREIMAN et al, 1984) .

A operacionalização da árvore de decisão para início da análise dos dados é computadorizada e se inicia com um nó raiz que contém todas as observações da amostra.

Os nós seguintes intermediários dividem-se em dois nós descendentes: esquerda e direita (GERSTING, 1993; SAFAVIAN; LANDGREBE, 1991; THEODORIDIS; KOATROUMBAS, 2006; WITTEN; FRANCK, 2005). Quando os dados satisfazem o teste lógico do nó intermediário seguem para o direito e quando não satisfazem seguem para o esquerdo. Cada nó corresponde a uma divisão em uma covariável particular.

O modelo é ajustado mediante sucessivas divisões binárias no conjunto de dados com o objetivo de tornar os subconjuntos resultantes cada vez mais homogêneos em relação à variável resposta. O processo de divisão repete-se até que nenhuma das variáveis selecionadas mostre influência significativa na divisão ou quando o tamanho do subconjunto for muito pequeno (BREIMAN et al, 1984).

O ajuste do modelo final foi avaliado por meio da estimativa de risco, que identifica os casos que foram incorretamente classificados. A estimativa de risco indica em que medida a árvore prediz corretamente os resultados, comparando a diferença entre o valor ajustado estimado pelo modelo e o valor real observado na amostra (BREIMAN L et al, 1984) . Neste estudo o modelo apresentou um bom ajuste, com estimativa de risco de classificação de 0,22. Conclui-se, portanto, que foram classificados corretamente 78% das informações.

3.6.3.3 Regressão linear

Para identificar a correlação entre os níveis de quimiocinas urinárias e os níveis de perda de albumina na urina utilizamos a regressão linear que permite identificar o grau de relação entre variáveis através de um modelo matemático.

3.7 Considerações éticas

Todos os pacientes e voluntários participantes desse estudo a partir do momento que preencheram os critérios de inclusão, foram informados sobre o projeto e convidados a participarem. Após a leitura e assinatura do TCLE, deu-se início às atividades. Os objetivos, metodologia simplificada, riscos e benefícios da participação foram explicados a todos de acordo com a Resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A pesquisadora leu os termos de consentimento (APÊNDICES 8,9,10 e 11), esclareceu dúvidas e o entregou aos pacientes e aos voluntários. Eles também foram informados 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 que os dados provenientes do estudo seriam apresentados à comunidade científica, entretanto, sem identificação dos pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e pelo Comitê de Ética do Hospital São João de Deus/Divinópolis.

3. RESULTADOS

4.1 Análises Descritivas

Dos 160 indivíduos estudados 89 (55,8%) eram homens, 87 eram pardos (54,4%), e a mediana da idade era 40 anos (TAB 3 - APÊNDICE 1). As medidas antropométricas (TAB 4 APÊNDICE 1) mostraram medianas: peso de 63Kg , altura de 165cm, índice de massa corporal (IMC) de 23,51 Kg/m² e superfície corpórea de 1,69 m².

A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) tiveram medianas de 120mmHg e 80mmHg, respectivamente (TAB 5). A microalbuminúria teve uma mediana de 30 mg/24horas (TAB 5).

TABELA 5 - Estatística descritiva dos níveis pressóricos e microalbuminúria (n=160)

Variáveis Clínicas laboratoriais		
Microalbuminúria		
Mediana	30	
Quartil 1	8,6	
Quartil 3	30	
II	21,4	
Pressão Arterial	PAS	PAD
Mediana	120,0	80,0
Quartil 1	110,0	70,0
Quartil 3	131,5	80,0
II	20,1	

A tabela 6 apresenta os resultados da análise descritiva para os níveis urinários e séricos das quimiocinas em picogramas por ml (pg/ml).

TABELA 6 - Estatística descritiva das quimiocinas urinárias e séricas de 160 indivíduos estudados no Hospital das Clínicas da UFMG no período de outubro de 2008 a julho de 2010

	Níveis urinários (pg/ml)					Níveis séricos (pg/ml)				
	IL-8 /CXCL8	MCP-1 /CCL2	Eotaxina /CCL11	RANTES /CCL5	MIP-1 α /CCL3	IL-8 /CXCL8	MCP-1 /CCL2	Eotaxina /CCL11	RANTES /CCL5	MIP-1 α /CCL3
Mediana	41,0	54,0	28,8	47,4	15,6	228,1	677,8	308,4	14570,8	231,1
II	53,4	143,7	15,2	55,0	8,5	644,4	696,0	256,1	5803,2	92,4

II = Intervalo interquartilico

4.2 Análises Univariadas

Comparação entre os grupos

Houve diferenças significativas entre os grupos comparados para todas as variáveis demográficas analisadas ($p < 0,05$). Registra-se maior proporção de homens no grupo EHE s/LR e de mulheres no grupo VS. Não foram observados pacientes de cor preta nos grupos EHE s/LR, HI e GN s/E e a mediana de idade foi mais elevada no grupo EHE s/LR e mais baixa no grupo VS (TAB 7- APÊNDICE 2).

TABELA 8 - Comparação entre as variáveis: hipertensão arterial sistêmica, microalbuminúria de 160 indivíduos estudados no Hospital das Clínicas da UFMG, categorizados em 5 grupos, no período de outubro de 2008 a julho de 2010.

Variáveis	Grupos										Valor de p
	Grupo EHE s\LR		Grupo EHE c\LR		Grupo HI		Grupo GN s\E		Grupo VS		
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	
Microalbuminúria											
≤30mg/24hrs	68	100,0	0	0,0	27	100,0	0	0,0	31	100,0	<0,001 *
> 30mg/24hrs	0	0,0	12	100,0	0,0	0,0	22	100,0	0	0,0	
Hipertensão Arterial Sistêmica											
Sim	22	32,4	8	66,7	2	7,4	14	63,6	0	0,0	
Não	46	67,6	4	33,3	25	92,6	8	36,4	31	100,0	<0,001*

* teste Quiquadrado de Pearson

A maior prevalência de história de hipertensão ocorreu em pacientes do grupo EHE c/LR (66,7%) (TAB 8). Menores medianas de PAS e PAD foram identificadas nos pacientes do grupo VS. As medidas antropométricas não apresentaram variação com valor estatístico entre os grupos (TAB 9- APÊNDICE 3).

Na tabela 10 estão apresentadas as quimiocinas e os valores de significância estatística quando comparados os cinco grupos estudados. De acordo com os resultados da Tabela 10 houve diferença significativa entre os grupos para a maioria das quimiocinas analisadas, exceto IL8/CXCL8 urinária e RANTES/CCL5 sérica. Salienta-se que as maiores medianas das quimiocinas urinárias e séricas significativas (circuladas na tabela 10) foram encontradas no grupo EHE c/LR. A eotaxina/CCL11, RANTES/CCL5 e MIP-1 α /CCL3 urinárias apresentaram as menores medianas no grupo EHE s/LR.

TABELA 10 - Associação entre as quimiocinas séricas e urinárias com os grupos participantes de 160 indivíduos estudados no Hospital das Clínicas da UFMG no período de outubro de 2008 a julho de 2010

Variáveis contínuas (pg/ml)	Grupos										Valor -p *
	Grupo EHE s/LR		Grupo EHE c/LR		Grupo HI		Grupo GN s/E		Grupo VS		
	M	II	M	II	M	II	M	II	M	II	
Níveis urinários das quimiocinas											
IL-8/CXCL8	45,0	29,3	27,2	101,5	25,5	96,7	57,3	103,2	32,1	60,7	0,102
MCP-1/CCL2	70,4	101,3	249,0	813,9	55,5	134,7	58,9	418,8	8,7	41,7	<0,001
Eotaxina /CCL11	22,6	8,1	48,2	32,5	35,5	19,2	33,2	27,1	28,5	12,7	<0,001
RANTES /CCL5	39,0	38,3	87,4	278,6	54,8	50,0	63,6	82,9	43,8	36,5	<0,001
MIP-1 α /CCL3	12,7	2,7	22,7	8,3	18,4	7,7	21,1	33,9	16,4	9,9	<0,001
Níveis séricos das quimiocinas											
IL8/CXCL8	187,1	325,0	212,5	136,6	1771,6	3249,0	194,7	207,6	286,4	221,4	<0,001
MCP-1/CCL2	767,8	593,7	1141,8	785,1	1069,2	682,1	420,2	303,1	316,0	203,9	<0,001
Eotaxina /CCL11	334,3	219,9	385,0	625,1	335,6	290,5	225,9	264,4	202,1	152,1	<0,001
RANTES /CCL5	11978,3	10957,1	14910,2	6990,4	15705,2	4580,7	14912,1	2638,4	15222,9	2881,9	0,757
MIP -1 α /CLL3	241,4	348,1	617,7	1282,8	735,1	820,7	155,6	135,6	123,2	224,6	<0,001

M=Mediana II = Intervalo Interquartilico *Teste Kruskal-Wallis

4.2.2 Análises de comparações múltiplas

Na tabela 11 estão apresentadas as *quimiocinas urinárias* e os valores de significância estatística quando procuramos definir entre quais grupos estão localizadas as diferenças significativas.

TABELA 11 - Comparações múltiplas das *quimiocinas urinárias* entre os grupos participantes de estudo realizado no Hospital das Clínicas da UFMG no período de outubro de 2008 a julho de 2010

Variáveis contínuas (pg/ml)	Comparações	Valor de p
MCP-1/CCL2	EHE s\LR - EHE c\LR	0,001
	EHE s\LR - HI	0,953
	EHE s\LR - GN s\E	0,814
	EHE s\LR - VS	<0,001
	EHE c\LR - HI	0,003
	EHE c\LR - GN s\E	0,039
	EHE c\LR - VS	<0,001
	HI - GN s\E	0,196
	HI - VS	0,070
	GN s\E - VS	0,006
Eotaxina/CCL11	EHE s\LR - EHE c\LR	<0,001
	EHE s\LR - HI	<0,001
	EHE s\LR - GN s\E	<0,001
	EHE s\LR - VS	0,135
	EHE c\LR - HI	0,083
	EHE c\LR - GN s\E	0,140
	EHE c\LR - VS	<0,001
	HI - GN s\E	0,888
	HI - VS	<0,001
	GN s\E - VS	0,001
RANTES/CCL5	EHE s\LR - EHE c\LR	0,001
	EHE s\LR - HI	0,004
	EHE s\LR - GN s\E	0,004
	EHE s\LR - VS	0,369
	EHE c\LR - HI	0,078
	EHE c\LR - GN s\E	0,222
	EHE c\LR - VS	0,005
	HI - GN s\E	0,828
	HI - VS	0,051
	GN s\E - VS	0,031
MIP-1 α /CCL3	EHE s\LR - EHE c\LR	<0,001
	EHE s\LR - HI	<0,001
	EHE s\LR - GN s\E	<0,001
	EHE s\LR - VS	0,004
	EHE c\LR - HI	0,033
	EHE c\LR - GN s\E	0,492
	EHE c\LR - VS	0,005
	HI - GN s\E	0,196
	HI - VS	0,070
	GN s\E - VS	0,006

Teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni (p<0,005)

A seguir resumimos a tabela acima dando destaque para as comparações dos EHE c/LR com os outros grupos. Os valores de MCP-1/CCL2 urinária encontrados no grupo EHE c/LR mostraram diferença significativa quando comparados com os grupos EHE s/LR, HI, e VS, mas não quando comparados aos valores encontrados no grupo GN s/E. A quimiocina

urinária eotaxina/CCL11 não apresentou diferenças significativas quando comparado o grupo EHE c/LR com os grupos HI e GN s/E, porém a comparação foi significativa quando aquele grupo foi comparado com os grupos EHE s/LR e VS. A MIP-1 α /CCL3 urinária apresentou diferenças significativas quando comparada entre o grupo EHE s/LR e todos os outros quatro grupos. E, ainda, quando se compararam os grupos com EHE c/LR e VS.

Na tabela 12 estão apresentadas as quimiocinas séricas e os valores de significância estatística quando procuramos definir entre quais grupos estão localizadas as diferenças significativas. Destacamos as comparações dos EHE c/LR com os outros grupos.

A quimiocina sérica MCP-1/CCL2, apresentou diferença significativa quando comparada entre o grupo EHE c/LR e o GN s/E. É interessante ressaltar que a MIP-1 α /CCL3 sérica apresentou diferença estatística quando se comparou os grupos EHE s/LR e HI, mas não teve diferença significativa nos níveis séricos quando comparados os grupos EHE s/LR com EHE c/LR.

TABELA 12

Comparações Múltiplas das *quimiocinas séricas* entre os grupos participantes de estudo realizado no Hospital das Clínicas da UFMG no período de outubro de 2008 a julho de 2010

Variáveis (pg/ml)	contínuas	Comparações	Valor de p
IL8		EHE s\LR - EHE c\LR	0,467
		EHE s\LR - HI	<0,001
		EHE s\LR - GN s\E	0,554
		EHE s\LR - VS	0,086
		EHE c\LR - HI	0,066
		EHE c\LR - GN s\E	0,505
		EHE c\LR - VS	0,481
		HI - GN s\E	0,001
		HI - VS	0,006
		GN s\E - VS	0,170
MCP-1/CCL2		EHE s\LR - EHE c\LR	0,002
		EHE s\LR - HI	0,004
		EHE s\LR - GN s\E	0,001
		EHE s\LR - VS	<0,001
		EHE c\LR - HI	0,377
		EHE c\LR - GN s\E	<0,001
		EHE c\LR - VS	<0,001
		HI - GN s\E	<0,001
		HI - VS	<0,001
		GN s\E - VS	0,023
Eotaxina		EHE s\LR - EHE c\LR	0,484
		EHE s\LR - HI	0,954
		EHE s\LR - GN s\E	0,034
		EHE s\LR - VS	<0,001
		EHE c\LR - HI	0,403
		EHE c\LR - GN s\E	0,052
		EHE c\LR - VS	0,009
		HI - GN s\E	0,124
		HI - VS	0,007
		GN s\E - VS	0,481
MIP-1 α		EHE s\LR - EHE c\LR	0,073
		EHE s\LR - HI	0,001
		EHE s\LR - GN s\E	<0,003
		EHE s\LR - VS	<0,001
		EHE c\LR - HI	0,831
		EHE c\LR - GN s\E	0,004
		EHE c\LR - VS	0,001
		HI - GN s\E	<0,001
		HI - VS	<0,001
		GN s\E - VS	0,159

*Teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni ($p < 0,005$)

4.3 Regressão logística

Como descrito em métodos, inicialmente optamos por utilizar o modelo de regressão logística, mas devido à multicolinearidade entre as variáveis explicativas inseridas no modelo, as estimativas não apresentaram boa convergência e nenhum modelo adequado de regressão logística foi encontrado.

Diante da situação exposta, optamos então, por um segundo tipo de análise multivariada: a árvore de decisão que é um modelo de regressão não paramétrico e preditivo. Com esse modelo pudemos analisar os nossos resultados, mesmo diante de um grupo de variáveis explicativas fortemente correlacionadas.

4.4 Regressão linear

Os resultados a seguir mostraram uma relação direta entre o aumento da MCP-1/CCL2 urinária e os valores absolutos de microalbuminúria. A mesma correlação foi testada para as outras quimiocinas urinárias, porém, não apresentaram diferença estatística (APÊNDICES 5,6 e 7).

Regressão Linear - Valores absolutos de MCP-1/CCL2 urinária e albuminúria.

Variables Entered/Removed(b)

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Albuminuria (a)	.	Enter

a All requested variables entered.

b Dependent Variable: MCP1 urinária

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	,294(a)	,086	,081	242,12101	,086	14,748	1	156	,000

a. Predictors: (Constant), albuminuria

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	864554,941	1	864554,941	14,748	,000(a)
	Residual	9145122,999	156	58622,583		
	Total	10009677,940	157			

a Predictors: (Constant), albuminuria

b Dependent Variable: MCP1 urinária

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	121,558	19,912		6,105	,000	82,226	160,891
	albuminuria	,021	,005	,294	3,840	,000	,010	,031

4.5 Análise Multivariada – Árvore de decisão

Nome dos grupos

Nó 0			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal		42,5	68
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal		7,5	12
Equistossomose hepatointestinal		16,9	27
Glomerulopatia sem esquistossomose	sem	13,8	22
Saudáveis		19,4	31
Total		100,0	160

MIP-1 α urinária
Improvement – 0,115

$\leq 14,34$

$> 14,34$

Nó 1			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	sem	76,5	52
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	com	0,0	0
Equistossomose hepatointestinal		1,5	1
Glomerulopatia sem esquistossomose	sem	2,9	2
Saudáveis		19,1	13
Total		42,5	68

Nó 2			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	sem	17,4	16
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	com	13,0	12
Equistossomose hepatointestinal		28,3	26
Glomerulopatia sem esquistossomose	sem	21,7	20
Saudáveis		19,6	18
Total		7,5	92

MCP1 sérica
Improvement – 0,053

MIP1 α sérica
Improvement – 0,058

$\leq 490,10$

$> 490,10$

$\leq 61,93$

$> 61,93$

Nó 3			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal		44,4	16
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal		0,0	0
Equistossomose hepatointestinal		0,0	0
Glomerulopatia sem esquistossomose		7,4	2
Saudáveis		48,1	13
Total		16,9	27

Nó 4			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal		97,6	40
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal		0,0	0
Equistossomose hepatointestinal		2,4	1
Glomerulopatia sem esquistossomose		0,0	0
Saudáveis		0,0	0
Total		25,6	41

Nó 5			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal		0,0	0
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal		0,0	0
Equistossomose hepatointestinal		0,0	0
Glomerulopatia sem esquistossomose		0,0	0
Saudáveis		100,0	10
Total		100,0	10

Nó 6			
Category		%	n
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal		19,5	16
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal		14,6	12
Equistossomose hepatointestinal		31,7	26
Glomerulopatia sem esquistossomose		24,4	20
Saudáveis		9,8	8
Total		51,2	82

Continuação da árvore de decisão

Nó 3

Nó 6

RANTES/CCL5 sérico

IL8 sérico

Improvement - 0,054

Improvement - 0,046

≤11509,84

>11509,84

≤ 1030,40

>1030,40

Nó 7			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	100	10	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	0,0	0	
Esquistossomose hepatointestinal	0,0	0	
Esquistossomose hepatointestinal Glomerulopatia sem esquistossomose	0,0	0	
esquistossomose Saudáveis	0,0	0	
Total	6,2	10	-

Nó 8			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	11,8	2	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	0,0	0	
Esquistossomose hepatointestinal	0,0	0	
Glomerulopatia sem esquistossomose	0,0	0	
Saudáveis	76,5	13	
Total	10,6	17	-

Nó 9			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	23,2	13	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	17,9	10	
Esquistossomose hepatointestinal	14,3	8	
Glomerulopatia sem esquistossomose	33,9	19	
Saudáveis	10,7	6	
Total	35,0	56	-

Nó 10			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	11,5	3	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	7,7	2	
Esquistossomose hepatointestinal	69,2	18	
Glomerulopatia sem esquistossomose	3,8	1	
Saudáveis	7,7	2	
Total			-

Eotaxina Urinária
Improvement - 0,041

≤ 26,73

> 26,73

Nó 11			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	69,2	9	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	0,0	0	
Esquistossomose hepatointestinal	7,7	1	
Glomerulopatia sem esquistossomose	0,0	0	
Saudáveis	23,1	3	
Total	8,1	13	-

Nó 12			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	9,3	4	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	23,3	10	
Esquistossomose hepatointestinal	16,3	7	
Glomerulopatia sem esquistossomose	44,2	19	
Saudáveis	7,0	3	
Total	26,9	43	-

MCP-1/CCL2 sérico
Improvement - 0,039

≤ 634,25

> 634,25

Nó 13			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	0,0	0	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	0,0	0	
Esquistossomose hepatointestinal	0,0	0	
Glomerulopatia sem esquistossomose	75,0	15	
Saudáveis	15,0	3	
Total	12,5	20	-

Nó 14			
Category	%	n	
Esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal	17,4	4	
Esquistossomose hepatoesplênica com lesão renal	43,5	10	
Esquistossomose hepatointestinal	21,7	5	
Glomerulopatia sem esquistossomose	17,4	4	
Saudáveis	0,0	0	
Total	14,4	23	-

Figura 6 - Árvore de decisão por meio do algoritmo CART avaliando os fatores associados aos grupos de estudo

De acordo com os resultados da figura 6, no nó raiz (primeiro nó), o fator que melhor distinguiu os cinco grupos comparados foi a quimiocina MIP-1 α /CCL3 urinária. Ao se observar a figura nota-se que as quimiocinas MCP-1/CCL2 urinária, RANTES/CCL5 urinária, IL-8/CXCL8 urinária e eotaxina/CCL11 sérica não foram selecionadas pelo modelo para avaliar graus de impureza. Provavelmente, isso se deve a dois fatos: primeiro, estas variáveis são colineares e os valores encontrados não foram suficientemente diferenciados para caracterizar a homogeneidade dos grupos ou, segundo, na análise multivariada, ao se analisar o comportamento das variáveis explicativas com relação às variáveis respostas, aquelas perderam a significância antes identificada na análise univariada.

Para facilitar a compreensão serão apresentados os resultados da árvore de decisão na linha vertical a partir dos nós descendentes esquerdos.

Os pacientes com MIP-1 α /CCL3 urinária $\leq 14,34$ pg/ml (nó 1) tem uma probabilidade de 76,5% de terem esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal (EHE s\LR). Todos os pacientes com EHE c/LR possuem a MIP-1 α /CCL3 urinária $> 14,34$ pg/ml (nó 2).

Ao se acrescentar a quimiocina MCP-1/CCL2 sérica, a árvore gerou os nós 3 e 4 a partir do nó 1 e eles revelaram outra forte característica do grupo EHE s\LR, pois os pacientes que têm MCP-1/CCL2 sérica $> 490,10$ pg/ml associada ao MIP-1 α /CCL3 urinária $\leq 14,34$ pg/ml têm 97,6% de chance de serem esquistossomóticos hepatoesplênicos sem lesão renal. Esse acréscimo de variável definiu o perfil do grupo EHE s/LR. As associações das variáveis explicativas ainda revelaram que os 13 indivíduos saudáveis que permaneceram no lado esquerdo da árvore tiveram a MIP-1 α /CCL3 urinária $\leq 14,34$ pg/ml, MCP-1/CCL2 sérica $\leq 490,10$ pg/ml e RANTES/CCL5 sérica $> 11.509,84$ pg/ml definindo o perfil deste grupo.

Retornando ao nó raiz, onde se identificou que a quimiocina MIP-1 α /CCL3 urinária foi a variável explicativa que melhor distinguiu os cinco grupos estudados seguiremos o raciocínio

indutivo vertical à direita, a partir do nó 2 onde se considerou a MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34 pg/ml.

Associou-se a MIP-1 α /CCL3 sérica com pontos de corte \leq 61,93 pg/ml e >61,93 pg/ml e a árvore gerou os nós 5 e 6.

Os nós 9 e 10 foram criados a partir do nó 6 (MIP-1 α /CCL3 >61,93 pg/ml) associados a IL-8/CXCL8 com pontos de corte IL-8/CXCL-8 sérico \leq 1.030,40 pg/ml e IL-8/CXCL-8 sérico >1.030,40 pg/ml. Ao agregar os valores de IL-8/CXCL-8 sérico >1.030,40 pg/ml aos valores de MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34 pg/ml e MIP-1 α /CCL3 sérica >61,93 pg/ml houve uma probabilidade de 69,2% de os pacientes terem esquistossomose hepatointestinal.

Todos os pacientes com EHE c\LR (12;100%), a partir do nó raiz, foram alocados no nó 2, ou seja, tinham MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34 pg/ml. No nó 6, todos os integrantes desse grupo tiveram MIP-1 α /CCL3 sérica >61,93 pg/ml. No nó 9, 10 dos 12 pacientes com EHE c\LR tiveram IL-8 /CXCL8 sérica \leq 1030,40 pg/ml. Nos nós 12 e 14, 10 dos 12 pacientes do grupo EHE c\LR tinham eotaxina/CCL11 urinária >26,73 pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica >634,25 pg/ml. Portanto, a maioria dos pacientes (83%) com EHE c\LR apresentavam o seguinte perfil: MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34 pg/ml, MIP-1 α /CCL3 sérica >61,93 pg/ml, IL-8 /CXCL8 sérica \leq 1030,40 pg/ml, eotaxina/CCL11 urinária >26,73pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica >634,25 pg/ml.

Dos 22 pacientes pertencentes ao grupo GN s/E, 20 apresentaram MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34 pg/ml e MIP-1 α /CCL3 sérica >61,93pg/ml. No nó 9, 19 dos 20 pacientes apresentavam IL-8/CXCL8 sérica \leq 1.030,40pg/ml, eotaxina/CCL11 urinária >26,73pg/ml. No nó 13, a MCP-1/CCL2 sérica foi \leq 634,25pg/ml. Portanto, a maioria dos pacientes com GN s/E apresentavam um perfil semelhante ao do grupo EHE c\LR, exceto pela MCP-1/CCL2 sérica \leq 634,25pg/ml.

Em síntese os resultados da árvore de decisão poderiam ser assim representados:

Grupo EHE s\LR = Esquistossomose forma hepatoesplênica sem lesão renal: MIP-1 α /CCL3 urinária \leq 14,34 pg/ml e MCP-1/CCL2 Sérico $>$ 490 pg/ml.

Grupo EHE c\LR = Esquistossomose forma hepatoesplênica com lesão renal: MIP-1 α /CCL3 urinária $>$ 14,34 pg/ml, MIP-1 α /CCL3 sérica $>$ 61, 93 pg/ml; IL-8/CXCL8 sérica \leq 1030,40 pg/ml; eotaxina/CCL11 urinária $>$ 26,73 pg/ml e MCP-1/CCL2 sérico $>$ 634 pg/ml.

Grupo HI = Esquistossomose forma intestinal: MIP-1 α /CCL3 urinária $>$ 14, 34 pg/ml; MIP-1 α /CCL3 sérico $>$ 61,93 pg/ml e IL-8/CXCL8 sérico $>$ 1030,40 pg/ml.

Grupo GN s\E = Glomerulopatia sem esquistossomose: MIP-1 α /CCL3 urinária $>$ 14, 34 pg/ml, MIP-1 α /CCL3 sérica $>$ 61, 93 pg/ml; IL-8/CXCL8 sérica \leq 1030,40 pg/ml; eotaxina /CCL11 urinária $>$ 26,73 pg/ml e MCP-1/CCL2 sérico \leq 634 pg/ml.

Grupo VS= voluntários saudáveis: MIP-1 α /CCL3 urinária \leq 14, 34 pg/ml, MCP-1/CCL2 sérica \leq 490,10 pg/ml e RANTES/CCL5 sérica $>$ 11,509,84 pg/ml.

4. DISCUSSÃO

Os pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e lesão renal (83%) apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 na urina >14,34pg/ml, MIP-1 α /CCL3 no soro >61,93pg/ml, IL-8/CXCL8 sérica \leq 1030,10pg/ml, eotaxina/CCL11 urinária >26,73pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica >634,25pg/ml. Esta é a primeira descrição do perfil de quimiocinas em pacientes com lesão renal esquistossomótica.

Os primeiros estudos com biomarcadores reportaram até duas citocinas em modelos animais e no homem. Atualmente, os autores descrevem várias citocinas na mesma doença (perfil), porque a interação destas proteínas representa melhor o processo inflamatório. Por isso, dividimos a discussão em dois itens: quimiocinas isoladas e perfil de quimiocinas.

5.1 Medidas isoladas de quimiocinas em animais e pacientes com e sem lesão renal.

Em nossos resultados os pacientes com outras glomerulopatias por causas diversas sem esquistossomose apresentaram perfil muito semelhante ao encontrado nos hepatoesplênicos com lesão renal, exceto pela MCP-1/CCL2 sérica que em 75% dos pacientes desse grupo era \leq 634,25pg/ml. Deve-se realçar que o perfil de quimiocinas avaliado aqui não foi descrito em outras glomerulopatias e nem foram definidos os pontos de corte dos níveis de quimiocinas encontrados em nossa análise. Seria desejável confirmá-los em outros estudos, pois, assim, eles poderiam identificar pacientes que apresentam glomerulopatia de diversas etiologias.

A MCP-1/CCL2 recruta macrófagos para os tecidos lesados e possui importante papel na indução da nefropatia diabética em modelos experimentais (CHOW et al, 2006). Há outros estudos mostrando o aumento de MCP-1 no soro e no tecido renal de indivíduos com lesão renal glomerular de várias etiologias (MUKAIDA; HARADA; MATSUSHIMA, 1998; SEGERER, 2003; YONGCHO; SHUGUANG; XIANGQING, 2009). No presente estudo, a MCP-1/CCL2 sérica estava aumentada no soro dos hepatoesplênicos sem lesão renal. E mais ainda, a MCP-1/CCL2 sérica >634,25pg/ml separou os hepatoesplênicos com lesão renal dos pacientes com glomerulopatia de outras etiologias. Como esta quimiocina encontrava-se elevada no soro de hepatoesplênicos e, segundo a literatura, também se encontra aumentada

em indivíduos com glomerulopatia de qualquer etiologia era de se esperar que ela apresentasse valores mais elevados na presença das duas patologias (EHE+LR). Os nossos achados confirmaram essa previsão.

No homem, o aumento de MCP-1/CCL2 no rim constitui uma característica da lesão renal encontrada no diabetes melito; está associada ao recrutamento de macrófagos como descrito antes, mas também está associada à excreção renal de albumina, lesão túbulo-intersticial e progressão da doença. A neutralização da atividade da MCP-1/CCL2 pode ser um alvo no tratamento da lesão renal nestes pacientes. Já tem sido demonstrado que o bloqueio do sistema renina-angiotensina em pacientes com diabetes melito tipo 2 e lesão renal diminui os níveis urinários de MCP-1/CCL2 a medida que a nefropatia é controlada (AMANN; TINZMANN; ANGELKORT, 2003). Uma nova estratégia para o tratamento baseia-se no bloqueio da aldosterona que pode diminuir a inflamação renal (efeito renoprotetor) por modulação na produção de MCP-1/CCL2 (HANS et al, 2006). Estudos semelhantes usando moduladores da MCP-1/CCL2 podem ser aplicados à na glomerulopatia esquistossomótica.

Em diabéticos, Ibrahim e Rashed em 2008, encontraram relação entre o aumento da MCP-1/CCL2 urinária e a presença de nefropatia diabética; também observaram que a MCP-1/CCL2 na urina é mais elevada nos pacientes com macroalbuminúria comparada com os que apresentavam microalbuminúria. Nossos dados mostram uma correlação da MCP-1/CCL2 urinária e microalbuminúria (coeficiente de regressão $b=121,6$ e $r=0,294$, $p=0,000$); portanto, aumento de 1mg de microalbuminúria em 24 horas indica aumento médio de 121,6pg/ml da MCP-1/CCL2 urinária (APÊNDICE 4). A MCP-1/CCL2 urinária, além de ser marcador de proteinúria, poderia ser utilizada como marcador de gravidade da lesão renal por causas diversas. As outras quimiocinas urinárias não mostraram correlação significativa com os níveis de perdas protéicas na urina (APÊNDICES 5, 6 e 7).

Na glomerulonefrite lúpica, vários estudos no homem e em animais sugerem a participação da MCP-1/CCL2 e da IL-8/CXCL8 na lesão renal (KELLEY; ROVIN, 2003; ROVIN; PHAN, 1998). Recentemente, Rovin et al (2005) dosaram na urina as quimiocinas MCP-1/CCL2 e

IL-8/CXCL8 antes e após os períodos de agudização da nefrite em pacientes com lupo eritematoso sistêmico. Os autores concluíram que a MCP-1/CCL2 urinária é um bom biomarcador de inflamação renal nestes casos. A IL-8/CXCL8 não teve a mesma importância da MCP-1/CCL2.

Na síndrome nefrótica idiopática em crianças, Souto et al (2008) demonstraram que a IL-8/CXCL8 e a TGF β -1 estavam envolvidas na patogênese da lesão renal e que não houve alterações nos níveis urinários de MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5.

Pode-se notar que estudos diferentes têm encontrado resultados variados. Isto, provavelmente se deve a uma série de fatores, como a seleção de pacientes, métodos diferentes, patologias distintas ou estágios evolutivos não comparáveis. Entretanto, o papel patogênico destas quimiocinas na inflamação renal parece bem demonstrado em modelos animais e no homem. Por exemplo, Yongcho e colaboradores (2009), ao estudar tecido renal de pacientes com glomerulonefrite por IgA (glomerulonefrite de Berger), encontraram maior expressão de MCP-1/CCL2 no rim e associação entre a gravidade da lesão renal e do prognóstico clínico da doença.

Nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal observou-se o seguinte perfil: MIP-1 α /CCL3 na urina $\leq 14,34$ pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica $>490,10$ pg/ml. Outros autores já documentaram o aumento de MCP-1/CCL2 no soro dos hepatoesplênicos (FALCÃO et al, 2002; SOUZA et al, 2005; SOUSA-PEREIRA et al, 2006). Não há na literatura estudos sobre quimiocinas na urina de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica. O encontro de níveis isolados de MIP-1 α /CCL3 mais baixos na urina de pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos sem lesão renal quando comparado com aqueles com lesão renal, e ainda com os com glomerulopatia s/E sugere que esta quimiocina atravessa o glomérulo lesado durante a glomerulopatia mas não confirma o seu papel na gênese da doença renal esquistossomótica. Estudos sobre a presença de MIP-1 α /CCL3 no tecido renal de pacientes com glomerulopatia devem ser feitos para confirmar essa hipótese.

Os pacientes com esquistossomose hepatointestinal apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 urinária >14,34pg/ml, MIP-1 α /CCL3 sérica >61,93pg/ml e IL-8/CCL11 sérica >1030,10pg/ml. Não há na literatura avaliação da MIP-1 α /CCL3 urinária em pacientes com esquistossomose hepatointestinal. Em nosso estudo, os níveis séricos isolados de MIP-1 α /CCL3 foram significativamente maiores nos indivíduos com esquistossomose hepatointestinal quando comparados aos hepatoesplênicos com e sem lesão renal (TABELA 10), ao contrário do que foi descrito anteriormente, ou seja, níveis séricos de MIP-1 α associados a fibrose hepática (FALCAO et al, 2002; SOUZA et al, 2005). Os pacientes recrutados pelos autores citados (hepatoesplênicos e hepatointestinais) eram provenientes de área endêmica do nordeste de Minas Gerais, com doença ativa (ovos viáveis nas fezes) e fibrose hepática incipiente nos hepatoesplênicos. Aqui, estudamos pacientes hepatointestinais de área endêmica com ovos viáveis nas fezes e ultrassom de abdomen sem fibrose hepática e pacientes com esquistossomose hepatoesplênica do ambulatório da FM-UFMG com fibrose hepática intensa, hipertensão portal grave e sem ovos viáveis nas fezes (tratados). Possivelmente os níveis mais elevados de MIP-1 α /CCL3 se justificariam pela presença de doença ativa (ovos e granulomas nos tecidos) em nossos hepatointestinais o que estimularia a produção de alguns mediadores inflamatórios no soro (MIP-1 α /CCL3, IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5).

Os voluntários saudáveis apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 urinária \leq 14,34pg/ml, MCP-1/CCL2 sérica \leq 490,10pg/ml e RANTES/CCL5 sérica >11.509,84pg/ml. Não há disponível na literatura perfil dessas quimiocinas com pontos de cortes definidos para indivíduos aparentemente saudáveis. Por isso acreditamos que esses resultados poderão servir de referência para estudos futuros, pois permitirão a comparação entre portadores de patologias diagnosticadas previamente com indivíduos aparentemente saudáveis.

5.2 Perfil de quimiocinas em animais e pacientes com e sem lesão renal

Alguns autores mediram grupos de citocinas no soro e na urina de pacientes com a nefropatia do diabetes melito (VAYADA, 2011; WOLKOW et al, 2008; TASHIRO et al, 2002). Vayada

(2011), por exemplo, mostrou que pacientes diabéticos com microalbuminúria tinham aumento de IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10 e MCP-1/CCL2 na urina. Não houve correlação entre os níveis urinários de albumina e o nível das citocinas mensuradas na urina. Tashiro et al (2002) mostraram que a IL-8/CXCL8 e a MCP-1/CCL2 urinárias estão elevadas em pacientes com nefropatia diabética e correlacionavam com a gravidade da lesão renal. Em nosso estudo, quantificamos as quimiocinas na urina dos pacientes de todos os grupos. Conforme já descrito, nossos achados sugeriram a MCP-1/CCL2 urinária como marcador de gravidade da lesão renal.

Poucos estudos avaliaram o papel das quimiocinas na esquistossomose humana. Souza e colaboradores (2011) destacam que durante as etapas do ciclo evolutivo do *S.mansoni* nos diferentes tecidos, o helminto passa por significantes alterações morfológicas e bioquímicas que servem como “escape” contra o sistema imunológico do hospedeiro. Em um estudo, os autores encontraram aumento de RANTES/CCL5, eotaxina/CCL11 e MIP-1 α /CCL3 no plasma de pacientes com esquistossomose crônica (FALCAO et al, 2002) e os pacientes com maior nível plasmático de MIP-1 α /CCL3 tinham a forma hepatoesplênica. Estes achados foram confirmados em estudo posterior do mesmo grupo com maior ênfase no aumento de MIP-1 α /CCL3 como marcador da forma hepatoesplênica da esquistossomose (SOUZA et al., 2005). Outros autores descreveram aumento de MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, eotaxina/CCL11 e eotaxina2/CCL24 no plasma de hepatoesplênicos (SOUSA-PEREIRA et al, 2006). Em nosso estudo, além de encontrarmos a MIP-1 α /CCL3 elevada no soro dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, ela também se encontrava elevada na urina dos pacientes com lesão renal (TABELA 10). Este achado tem interesse na identificação da glomerulopatia. Em estudo recente, Silveira-Lemos et al (2010) avaliaram o perfil de quimiocinas e de receptores de quimiocinas em pacientes com esquistossomose mansônica aguda e compararam com controles doadores de sangue. As quimiocinas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, eotaxina-2/ CCL24 estavam muito elevadas no soro dos agudos. Os autores concluem que nos casos em que a eotaxina-2/CCL24 estava diminuída no soro havia maior aumento de MIP-1 α /CCL3 sérica e aumento da expressão dos receptores CCR5 e CXCR3 nos eosinófilos circulantes. No nosso estudo, os resultados mostraram que as quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 também estavam aumentadas não só nos pacientes com esquistossomose hepatointestinal, como nos pacientes com esquistossomose

hepatoesplênica, ou seja, forma crônica. Seria importante um estudo comparativo entre as formas aguda e crônica da esquistossomose.

Em síntese, utilizando-se a análise multivariada (árvore de decisão), encontrou-se um perfil característico nos pacientes com glomerulopatia não esquistossomótica (MIP-1 α /CCL3 na urina >14,3pg/ml, MIP-1 α /CCL3 no soro >61,9pg/ml, IL-8/CXCL8 sérica \leq 1030pg/ml, eotaxina/CCL11 urinária >26,7pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica \leq 634,2pg/ml). Nos esquistossomóticos com lesão renal a diferença do perfil acima foi a MCP-1/CCL2 sérica acima de 634,25pg/ml. Os pontos de corte criados pela árvore de decisão para a quimiocina sérica MCP-1/CCL2 > 634,25 e \leq 634,25 pg/ml ainda não havia sido descrito pela literatura como marcador de lesão renal em esquistossomóticos. Neste sentido, fizemos a curva ROC considerando os valores séricos contínuos de MCP-1/CCL2 sérica para identificação dos pacientes com EHE c/LR (APÊNDICE 5). A curva ROC de nossos resultados mostram área abaixo da curva de 0,91, sensibilidade e especificidade de 90%; estes resultados precisam ser confirmados em campo para diagnóstico da glomeronefrite esquistossomótica.

5. CONCLUSÕES

1. Perfil de quimiocinas do grupo de EHE com LR é semelhante ao do grupo com lesão renal de outras etiologias exceto pela MCP-1 sérica $>634,25$ pg/ml
2. A MCP-1 sérica $>634,25$ pg/ml sugere a simultaneidade da EHE e LR
3. Todos os pacientes com glomerulopatia (microalbuminúria >30 mg/24 horas) apresentavam MCP-1 urinária aumentada.
4. Houve correlação significativa e direta entre a MCP-1 urinária e a microalbuminúria.
5. Nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem lesão renal observou-se o seguinte perfil: MIP-1 α /CCL3 na urina $\leq 14,3$ pg/ml e MCP-1/CCL2 sérica $>490,1$ pg/ml. Esta associação de quimiocinas identifica 97,6% dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.
6. Os pacientes com esquistossomose hepatointestinal apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 urinária $>14,3$ pg/ml, MIP-1 α /CCL3 sérica $>61,9$ pg/ml e IL-8/CXCL8 sérica >1030 pg/ml.
7. Os voluntários saudáveis apresentaram o seguinte perfil de quimiocinas: MIP-1 α /CCL3 urinária $\leq 14,3$ pg/ml, MCP-1 sérica $\leq 490,1$ pg/ml e RANTES sérica $>11.509,8$ pg/ml.

6. PROPOSIÇÕES

- ✓ Avaliar em outro estudo, em área endêmica, se os pacientes com proteinúria e MCP-1 sérica >634,25pg/ml apresentam glomerulopatia esquistossomótica.

- ✓ Confirmar o perfil de quimiocinas para doença renal de etiologias diversas.

- ✓ Avaliar o papel dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) na evolução da glomerulonefrite esquistossomótica e nos níveis séricos e urinários da MCP-1/CCL2.

7. LIMITAÇÕES

- ✓ Realizar SWAP no grupo de saudáveis
- ✓ A influência da variável pressão arterial nos níveis séricos e urinários dos pacientes estudados deverá ser avaliada em outro estudo.
- ✓ Apresentar os resultados de exames de urina de avaliação do sedimento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENSUR, H., et al. Nephrotic Syndrome associated with hepatointestinal schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 34(4):273-276, julho-agosto, 1992.

AMANN, R.; TINZMANN, R.; ANGELKORT, B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care*, v. 26, p. 2421-2425, 2003.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Renal changes in patients with hepatoesplenic schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 20, p. 77-83, 1971.

ANDRADE, Z.A.; QUEIROZ, A.C. Renal lesions in hepatosplenic schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 36-40, 1968.

ANDRADE, Z.A.; ROCHA, H. Schistosomal glomerulopathy. *Kidney Int*, v. 16, n. 1, p. 23-29, 1979.

ARAYA, C.E. *et al.* A case of unfulfilled expectations: Cytokines in idiopathic minimal lesion nephritic syndrome. *Pediatr Nephrol*, v. 21, p. 603-10, 2006.

ATOCHINA, O. *et al.* A Schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1+ macrophages that suppress naïve CD4+ T cell proliferation via an IFN- γ and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol*, v. 167, p. 4293-4302, 2001.

AZEVEDO, L.S. *et al.* Renal transplantation and Schistosomiasis mansoni. *Transplantation*, v. 44, n. 6, p. 795-798, 1987.

BARSOUM, R. S. The changing face of schistosomal glomerulopathy. *Kidney Int*, v. 66: p. 2472-2484, 2004.

BARSOUM, R.S. *et al.* Hepatic macrophage function in schistosomal glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant*, v. 3, n. 5, p. 612-616, 1988.

BARSOUM, R.S. *et al.* Patterns of glomerular injury associateds with hepatointestinal schistosomiasis. *In: XII Egypt Congress of Nephrology. Cairo. 1992.*

BARSOUM, R.S. Schistosomal glomerulopathies: Editorial Review. *Kidney Int*, v. 44, n. 1, p. 1-12, 1993.

BARSOUM, R. *et al.* Immunoglobulin-A and the pathogenesis of schistosomal glomerulopathy. *Kidney Int*, v. 50: p. 920-928, 1996.

BARSOUM, R.S. Tropical parasitic nephropathies. *Nephrol Dial Transplant*, v. 14 (supp3), p. 79-91, 1999.

BAUMGART, M. *et al.* Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol*, v. 176, p. 5374-5387, 2006.

BELL, J.F. Application of classification trees to the habitat preference of upland birds. *Journal of Applied Statistics*, v. 23, n. 2-3, p. 340-359, 1996.

BINA, J.C. *et al.* A field study of proteinúria in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Brasil Trop*, v. 18, n. 1, p. 7-10, 1985.

BREIMAN L *et al.* *Classification and regression trees*. Pacific Grove-Califórnia: Wadsworth and Brooks, 1984.

BRITO, E.G.V. Patologia renal na esquistossomose mansônica hepatoesplênica: um estudo de material de biópsias renais. 1973. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1973.

BROSIUS, F.C. Trophic Factors and Cytokines in Early Diabetic glomerulopathy. *Experimental Diab. Res*, v. 4, p. 225-233, 2003.

BURDIN, N. *et al.* Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol*, v. 154, n. 6, p. 2533-2544, 1995.

CHANG,C.C. *et al.* Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein Kinase. *Journal of Biomedical Science*, v.18, p. 47, 2011.

CHAVARRIA, A.; ALCOCE-VARELA, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun Rev*, v. 3, n. 4, p. 251-60, 2004.

CHEEVER, A.W. *et al.* Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol*, v. 153, n. 2, p. 753- 759, 1994.

CHERNEY, D.Z.I. *et al.* The Acute Effect of Clamped Hyperglycemia on the Urinary Excretion of Inflammatory Cytokines/Chemokines in Uncomplicated Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, v. 34, n. 1, p. 177-180, Jan. 2011.

CHO, M.H. *et al.* Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol*, v. 23, p. 260-65, 2003.

CHOW, F.Y. *et al.* Intracellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *J Am Soc Nephrol*, v. 16, p. 1711–1722, 2005.

CHOW, F.Y. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney International*, v. 69, p. 73-80, 2006.

CHRISTO, P.P. *et al.* Cerebrospinal fluid levels of chemokines in HIV infected patients with and without opportunistic infection of the central nervous system. *J Neurol Sci*, v. 287, p. 79–83, 2009.

CHUGH, K.S.; SAKHUJA, V. Glomerular disease in the tropics. In: *Oxford textbook of clinical nephrology*. 2nd ed. Oxford: Oxf Ord University Press , 1998. p. 703-719.

COCKWELL, P. *et al.* In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney International*, v. 54, p. 827–836, 1998.

CORREIA, E.I.S.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Está desaparecendo a glomerulopatia da esquistossomose mansônica? *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 30, p. 341-3, 1997.

DE BRITO, T. *et al.* Editorial: *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v. 41, n. 5, p. 269-272, 1999.

DE BRITO, T. *et al.* Kidney biopsy in human schistosomiasis: an ultra-structural study (Preliminary report). *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v. 11, p. 62-64, 1969.

DE BRITO, T.; GUNJI, J.; CAMARGO, M.E. Advanced kidney disease in patients with hepatosplenic mansoni's schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v. 12, p. 225-235, 1970.

DEELDER, A.M. *et al.* Schistosoma mansoni: Characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Exp Parasitol*, v. 50, n. 1, p. 16-32, 1980.

EL-KORAIE, A.F. *et al.* Cytoskeletal protein expression and regenerative markers in schistosomal nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, v. 17, p. 803-812, 2002.

FALCÃO, P.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FRAGA, L.A. *et al.* Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1 α during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. *J Infect Dis*, v. 186, p. 1696–1700, 2002.

FALLON, P.G. *et al.* Immunopathology of Schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunol Today*, v. 21, p. 29-35, 2000.

FERREIRA, C.A.; SOARES, J.F.; CRUZ, F.R.B. Reconhecimento de Padrões em Estatística: uma abordagem comparativa. In: Proceedings of the V Brazilian Conference on Neural Networks – V Congresso Brasileiro de Redes Neurais PP, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica, Abr. 2001. p. 409-414.

FLORES VILLANUEVA, P.O. *et al.* Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. *J Immunol*, v. 152, n. 4, p. 1847-1855, 1994.

FOUGERAY, S. *et al.* Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. In: Cell Death and Disease, 2011. v. 2, p. 143.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde - FUNASA. Esquistossomose mansoni: guia texto. 4. ed. 2001.

GALKINA, E; LEY, K. Leukocyte Recruitment and Vascular Injury in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, V. 17, p. 368-377, 2006.

GARIN, E.H. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, v. 14, p. 872-8, 2000.

GELFAND, M. A possible relationship between the nephrotic syndrome and urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 57, p. 191, 1963.

GERSTING, J.L. *Mathematical Structures for Computer Science*. New York: W.H. Freeman and Company, 1993. p. 538.

HANS,S.Y; KIM, C.H; KIM, H.S. *et al.* Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetics rats. *J.Am. Soc.Neprol*, v. 17, p. 1362-1372, 2006.

HAWKINS, R. New biomarkers of acute kidney injury and the cardio-renal syndrome. *Korean J Lab Med*, v. 31, n.2, p. 72-80, Abr. 2011.

HESSE, M. *et al.* The pathogenesis of Schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HIRSCH, C.; GOES, A.M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. *Parasitology*, v. 112, n. 6, p. 529-535, 1996.

HOMEIDA, M. *et al.* Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection as determined by ultra-sound: a study in Gezira Sudan. *Am J Med Trop Hyg*, v. 39, n. 2, p. 196-201, 1988.

HOSHINO-SHIMIZU, S. *et al.* Human Schistosomiasis: *Schistosoma mansoni* antigen detection in renal glomeruli. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 70, p. 492- 496, 1977.

HOSMER, W.D.; LEMESHOW, S. *Applied Logistic Regression*. Wiley; 2000.

HOUBA, V. Experimental renal disease due to schistosomiasis. *Kidney Int*, v. 16, p. 30-43, 1979.

IBRAHIM, S.; RASHED, L. Correlation of urinary monocyte chemo-attractant protein-1 with other parameters of renal injury in type-II diabetes mellitus. *Saudi J Kidney Dis Transplant*, v. 19, n. 6, p. 911-917, 2008.

JIAO, B. *et al.* Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- β_1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *BioScience Trends*, v. 5, n. 4, p. 173-181, 2011.

KAPLAN, M.H. *et al.* Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg induced granulomatous response. *J Immunol*, v. 160, p. 1850-1856, 1998.

KARPUS, W. J. Chemokines and central nervous system disorders. *J Neurovirol*, v. 7, n. 6, p. 493-500, 2001.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop*, São Paulo, v. 14, p. 397-400, 1972.

KELLEY, V.R.; ROVIN, B.H. Chemokines: therapeutic targets for autoimmune and inflammatory renal disease. *Springer Semin Immunopathol*, v. 24, n. 4, p. 411-21, May, 2003.

KELLY, D.J. *et al.* Protein kinase C beta inhibition attenuates osteopontin expression, macrophage recruitment, and tubulointerstitial injury in advanced experimental nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, v. 16, p. 1654–1660, 2005.

LAMBERTUCCI, J.R. Contribuição ao estudo das alterações renais na salmonelose septicêmica prolongada. Tese de Doutorado. Medicina Tropical Faculdade de Medicina UFMG, 1984

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Envolvimento renal na associação Salmonella- Schistosoma mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 20, n. 2: p. 83-89, 1987.

LAMBERTUCCI, J.R. Glomerulonephritis in Salmonella-Schistosoma mansoni association. *Am J Trop Méd Hyg*, v. 38, n. 1: p. 97-102, 1988.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Schistosoma mansoni: assessment of morbidity before e after control. *Acta Trop*, v. 27, p. 101-109, 2000.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Glomerulonephritis in patients with hepatoesplênica schistosomiasis mansoni: still a cause for concern. In: 11^o SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESQUISTOSSOMOSE, Tema Livre. Anais. Salvador, 2008.

LEHMAN, J.R. *et al.* The association of *Schistosomiasis mansoni* and proteinuria in an endemic area: A preliminary report. *Am J Trop Méd Hyg*, v. 24, n. 4, p. 616-618, 1975.

LEVEY, A.S. *et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Inter Med*, v. 30: p. 461- 470, 1999

LÓPEZ, M. Aspectos renais da síndrome hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. (Tese de doutorado). Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, 1964.

LUKACS, N.W. *et al.* Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, v. 152, n. 12, p.5883- 5889, 1994.

MacDONALD, A.S.; ARAÚJO, M.I.; PEARCE, E. Immunology of parasitic helminth infections. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 2, p. 427-433, 2002.

MACHADO, E. Proteinúria na esquistossomose mansônica hepatoesplênica. (Estudo eletroforético da urina e do soro sanguíneo). Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 1965.

MAHMOUD, K.M. *et al.* Impact of schistosomiasis on patient and graft outcome after renal transplantation: 10 years' follow up. *Nephrol Dial Transplant*, v. 16, p. 2214-2221, 2001.

MARTINELLI, R. *et al.* Aspectos da evolução clínica da glomerulopatia associada à esquistossomose mansônica. *J Bras Nefrol*, v. 1, p. 20-24, 1979.

MARTINELLI, R.; BRITO, E.; ROCHA, H. Value of beta 1C/1A globulin serum levels as an early index of glomerular involvement in *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 29, n. 5: p. 882-885, 1980.

MARTINELLI, R.; PEREIRA, L.J.; ROCHA, H. The influence of anti-parasitic therapy on the course of the glomerulopathy associated with Schistosomiasis mansoni. *Clin Nephrol*, v. 27, n. 5, p. 229-32, 1987.

MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Revisão/atualização em nefrologia clínica: envolvimento glomerular na esquistossomose mansônica. *J Bras Nefrol*, v. 18, n. 3, p. 279-289, 1996.

MARTINELLI, R.; SILVEIRA, M.A.; ROCHA, H. Glomerulonefrites associadas às doenças parasitárias. *In: BARROS, R.T. et al. Glomerulopatias, patogenia, clínica e tratamento.* 2. ed, Sarvier, 2006. p.352.

MARTINS-FILHO, A.O. *et al.* Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. *Digestive diseases and sciences*, v. 44, n. 3, p. 570- 577, 1999.

MITCHELL, T. *Machine Learning.* Mc Graw, 1997

MOREIRA, M.A. *et al.* Effect of the treatment with methylprednisolone on the cerebrospinal fluid and serum levels of CCL2 and CXCL10 chemokines in patients with active multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, v. 114, p. 109–113, 2006.

MORIEARTY, P.L.; BRITO, E. Elution of renal antischistosome antibodies in human schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg*, v. 26, p. 717-722, 1977.

MUKAIDA, N.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) and monocytechemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1/CCL2), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev*. v. 9, p. 9-23, 1998.

MURPHY, P.M. *et al.* International union of pharmacology. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev*, v. 54, n. 1, p. 147-176, 2000.

NASH, T. Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 3, n. 6, p. 1085-1087, 1974.

NASH, T.; PRESCOTT, B.; NEVA, F.A. The characteristics of a circulating antigen in Schistosomiasis. *J Immunol*, v. 112, p. 1500-1507, 1974.

NASH, T.E. *Schistosomiasis in Harrison's principles of internal medicine*. 12th ed. Mc Graw-Hill Inc. 1991. p. 813.

NEVES, DAVID PEREIRA. *Parasitologia Humana*. 8. Ed. São Paulo: Atheneu, 1991.

NUSSENZVEIG, I. *et al.* Human *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy in Brazil. *Nephrol Dial Transplant*, v. 17, n. 1, p. 4-7, 2002.

NUSSENZVEIG, I.; DE BRITO, T. Glomerulopatia esquistossomótica. In: *Atualidades em nefrologia*. Sarvier, 2002.

OKADA, S. *et al.* Intercellular adhesion molecule 1 deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes*, v. 52, p. 2586-2593, 2003.

OKANO, M. *et al.* Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Functions as Adjuvant for Proteins by Inducing Th2-Type Response. *J Immunol*, v. 167, p. 442-450, 2001.

QI, W. *et al.* TGF-beta1 induces IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 through a connective tissue growth factor-independent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006.

QUEIROZ, P.F.; BRITO, E.; MARTINELLI, R. Nephrotic syndrome in patients with *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 22, n. 5, p. 662-628, 1973.

RABELLO, A.L. *et al.* Evaluation of proteinúria in an area of Brazil endemic for schistosomiasis using a single urine sample. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 87, n. 2, p. 187-189, 1993.

ROCHA, H. *et al.* Renal involvement in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Méd Hyg*, v. 25, n. 1, p. 108-115, 1976.

RODRIGUES, V.L.; OTONI, A.; VOIETA, I.; ANTUNES, C.M.; LAMBERTUCCI, J.R. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 638-642, Nov-Dez, 2010.

RODRIGUEZ, J.M.R. La Schistosomiasis Mansoni in Venezuela. Medicina Universidad Central de Venezuela. Caracas, 1942. p. 224.

ROVIN, B.H. *et al.* Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *J Am Soc Nephrol*, v. 16, p. 467-473, 2005.

ROVIN, B.H.; PHAN, L.P. V. Chemotactic factors and renal inflammation. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 31, n. 6, p. 1065-1084, Jun. 1998.

SAVAFIAN, S.R.; LANDGREBE, D.A. Survey of Decision Tree Classifier Methodology. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, v. 21, p. 660-674, 1991.

SCHLESSELMAN, J.J.; STOLLEY, P. D. Case-control studies: design, conduct, analysis. 1982.

SEGERER, S. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis*, v. 41, suppl 1, p. 15-8, 2003.

SHER, A.; McINTYRE, S.; VON-LICHTENBERG, F. *Schistosoma mansoni*: Kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Exp Parasitol*, v. 41, n. 2, p. 415-22, 1977.

SILVA, L.C. *et al.* Kidney biopsy in the hepatoesplenic form of infection with *Schistosoma mansoni* in man. *Bull World Health Organ*, v. 42, p. 907–910, 1970.

SILVEIRA-LEMOS, D. *et al.* Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 380-386, Jul. 2010.

SOBH, M. *et al.* Nephropathy in asymptomatic patients with active *Schistosoma mansoni* infection. *Int Urology Nephrology*, v. 22, n. 1, p. 37-43, 1990.

SOBH, M.A. *et al.* A prospective, randomized therapeutic trial for schistosomal specific nephropathy. *Kidney Int*, v. 35, n. 5, p. 904-907, 1989.

SOBH, M.A. *et al.* Characterization of kidney lesions in early Schistosomal-specific nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, v. 3, p. 392-398, 1988a.

SOBH, M.A. *et al.* Effect of anti-schistosomal treatment on schistosomal-specific nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, v. 3, n. 6, p. 744-751, 1988b.

SOBH, M. *et al.* *Schistosoma mansoni* nephropathy in Syrian golden hamster: effect of dose and duration of infection. *Nephron*, v. 59, n. 1: p. 121-130, 1991.

SOBH, M.A. *et al.* Impact of schistosomiasis on patient and graft outcome after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, v. 7, p. 858-864, 1992.

SOBH, M.A. *et al.* Infectious glomerulopathy induced by a defined agent (*Schistosoma mansoni*): progression despite early elimination of the causal agent. *Exp Nephrol*, v. 1, n. 4, p. 261-264, 1993.

SOBH, M.A. *et al.* Schistosomal specific nephropathy leading to end-stage renal failure. *Kidney Int*, v. 31, n. 4, p. 1006-1011, 1987.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol.*, v. 28, n. 9, p. 473-8, Set. 2006.

SOUTO, M.F. *et al.* Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res.*, v. 64, n. 6, p. 637-42, Dez. 2008.

SOUSA-PEREIRA, S.R. et al. Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunology*, 28, 473–478. 2006.

SOUZA, A.L.; ROFFÊ, E.; PINHO, V. et al. Potential role of chemokine macrophage inflammatory protein-1 α in human and experimental schistosomiasis. *Infect Immun*, v. 73, n. 4, p. 2515–2523, Abr. 2005.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Ver Brás Clin Med*. São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-7, Jul.-Ago. 2011.

STAVITSKY, A.B. Minireview: regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity*, v. 72, p.1-12, 2004.

TASHIRO, K. et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and interleukin-8 (IL-8/CXCL8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal.*, v. 16, n. 1, p. 1-4, 2002.

TERRAZAS, L.I. et al. The Schistosome oligosaccharide Lacto-N-neotetraose expands Gr1+ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4+ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol*, v. 167, p. 5294-5303, 2001.

TESCH, G. H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 294, p. 697–701, 2008.

THEODORIDIS, S., KOATROUMBAS, K. *Pattera recognition*. Academic Press, 2006. p. 885.

TUTTLE, K.R. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J Am Soc Nephrol*, v. 16, p. 1537-1538, 2005.

URUSHIHARA, M. et al. Addition of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker to CCR2 Antagonist Markedly Attenuates Crescentic Glomerulonephritis. *Hypertension*. V. 57, n. 3, p. 586-593, Mar., 2011.

VAIDYA, V.S. et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Kidney Int.*, v. 79, n. 4, p. 464-470, Fev., 2011.

VAN DEN BERG, J.G.; WEENING, J.J. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science*, v. 107, p. 125-36, 2004.

VAN MARCK, E.A.; DEELDER, A.M.; GIGASE, P.L. Effect of partial portal vein ligation on immune glomerular deposits in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Br J Exp Pathol*, v. 58, n. 4, p. 412-417, 1977.

WADA, T. *et al.* Up-regulation of monocyto chemoattractant protein- 1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int*, v. 58, p.1492-1499, 2000.

WAHL, S. *et al.* Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosis. *Kidney Int*, v. 51, p. 1370-1375, 1997.

WEAVER, C.T. *et al.* IL-17 Family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, v. 25: p. 821-825, 2007.

WEIR, D.M.; STEWART, J. Imunidade adquirida. In: *Imunologia básica aplicada*. 8. ed. Revinter, 2002. p.106.

WINN, T.A.; CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol*, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995.

WITTEN, I. H.; FRANCK, E. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*. 2nd ed. Morgan Kaufmann, 2005.

WOLF, F.N.Z. *et al.* Angiotensin II stimulates expression of chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: Role of angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest*. V.100, n.5,p.1047-1058, set., 1997.

WOLKOW, P.P. *et al.* Association of Urinary Inflammatory Markers and Renal Decline in Microalbuminuric Type 1 Diabetics. *J Am Soc Nephrol*, v. 19, p. 789-797, 2008.

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>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2011. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-schisto-mtg-07.htm>>. Acesso em: Jul., 2011.

YANG, L. et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood*, v. 106, n. 2: p. 584-592, 2005

YONGCHO, S.; SHUGUANG, Y.; XIANGQING, X. Expression of MCP-1 in renal tissues of patients with IgA nephropathy. *J. Cent South Univ (Med Sci)*, v. 34, n. 10, p. 1023-06, 2009.

ZATZ, R.; ROMÃO, J.E.; NORONHA, I.L. Nephrology in Latin América, with special emphasis on Brazil. *Kidney Int*, v. 63, supp 83, p. 131-134, 2003.

ZATZ, R; FUGIHARA, C.K. Mecanismo de Progressão das Glomerulopatias. *In: BARROS, R.T. et al. Glomerulopatias, patogenia, clínica e tratamento*. 2. ed. Sarvier, 2006. p.106.

APÊNDICE 1

TABELA 3- Estatística descritiva das variáveis demográficas estudadas (n=160)

	Frequência	Percentual
Sexo		
Masculino	89	55,6
Feminino	71	44,4
Cor		
Branca	65	40,6
Parda	87	54,4
Preta	8	5,0
Idade		
Mediana	40,0	
Quartil 1	29,0	
Quartil 3	52,0	

TABELA 4 - Estatística descritiva das medidas antropométricas (n=160)

Estatística	Peso(Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m ²)	SC (m ²)
Quartil 1	57,4	160,0	21,09	1,59
Mediana	63,0	165,0	23,51	1,69
Quartil 3	73,0	170,0	26,4	1,82

De acordo com os resultados da tabela 3, para a PAS a mediana foi de 120 e para PAD foi de 80 e a mediana da microalbuminúria foi 30.

APÊNDICE 2

TABELA 7 - Associação entre as variáveis demográficas e os grupos participantes do estudo

Variáveis	Grupos										Valor de p
	Grupo EHE		Grupo EHE		Grupo HI		Grupo GN s\E		Grupo VS		
	s\LR		c\LR								
	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	
Sexo											
Masculino	50	73,5	11	91,7	12	44,4	10	40,9	6	19,4	<0,001*
Feminino	18	26,5	1	8,3	15	55,6	12	59,1	25	80,6	
Cor											
Branca	28	41,2	3	25,0	0	0,0	10	45,5	24	77,4	<0,001**
Parda	36	52,9	9	75,0	27	100,0	12	54,5	3	9,7	
Preta	4	5,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	12,9	
Idade											
	M	IQ	M	IQ	M	IQ	M	IQ	M	IQ	<0,001***
	47,5	17,7	46,5	11,5	36,0	27,0	39,0	24,25	24,0	8,0	

M=Mediana II = Intervalo Interquartilico * teste Quiquadrado de Pearson ** teste exato de Fisher ***teste Kruskal-Wallis

APÊNDICE 3

TABELA 9 - Associação entre as medidas antropométricas, pressão arterial sistólica e diastólica e os grupos participantes do estudo

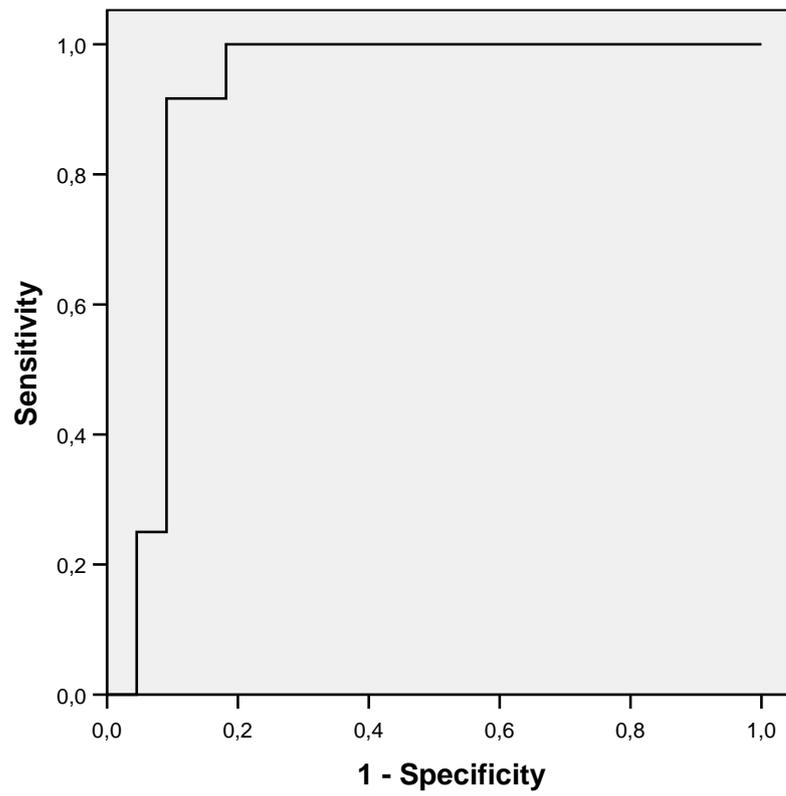
Variáveis	Grupos										Valor de p *
	Grupo EHE		Grupo EHE		Grupo HI		Grupo GN s\E		Grupo VS		
	s\LR		c\LR		M	II	M	II	M	II	
	M	II	M	II	M	II	M	II	M	II	
IMC	23,5	4,7	23,7	3,5	23,9	5,7	24,4	9,1	22,6	4,8	0,229
SC	1,7	0,2	1,7	0,2	1,6	0,3	1,7	0,2	1,6	0,2	0,101
PAS	120,0	20,0	130,0	20,0	125,0	35,0	130,0	22,5	110,0	10,0	<0,001
PAD	80,0	10,0	80,0	10,0	84,0	9,0	80,0	16,2	70,0	10,0	<0,002

M=Mediana II = Intervalo Interquartilico *Teste Kruskal-Wallis

APÊNDICE 4

CURVA ROQUE – MCP-1 E OS NÍVEIS DE MICROALBUMINÚRIA

ROC Curve



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): MCP1 soro

Área
,913

APÊNDICE 5

Regressão Linear - Valores absolutos de eotaxina /CCL11 urinária e albuminúria

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	albuminuria ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: EOTAXINA Nurinária

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,022 ^a	,000	-,006	50,40849

a. Predictors: (Constant), albuminuria

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	189,497	1	189,497	,075	,785 ^a
	Residual	393857,447	155	2541,016		
	Total	394046,944	156			

a. Predictors: (Constant), albuminuria

b. Dependent Variable: EOTAXINA Nurinária

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	42,925	4,164		10,310	,000	34,700	51,149
	Albuminuria	,000	,001	,022	,273	,785	-,002	,002

a. Dependent Variable: EOTAXINA Nurinária

APÊNDICE 6
Regressão Linear - Valores absolutos de RANTES/CCL5 urinária e albuminúria

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	albuminúria ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: RANTES urinária

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,207 ^a	,043	,037	463,41519

a. Predictors: (Constant), albuminúria

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1479995,995	1	1479995,995	6,892	,010 ^a
	Residual	3,307E7	154	214753,635		
	Total	3,455E7	155			

a. Predictors: (Constant), albuminúria

b. Dependent Variable: RANTES urinária

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	117,736	38,366		3,069	,003	41,945	193,527
	Albuminúria	,027	,010	,207	2,625	,010	,007	,047

a. Dependent Variable: RANTES urinária

APÊNDICE 7

Regressão Linear - Valores absolutos de MIP-1 alfa/CCL3 urinária e albuminúria

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	albuminuria ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MIP1alfa urinária

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,055 ^a	,003	-,003	166,06843

a. Predictors: (Constant), albuminuria

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	12739,178	1	12739,178	,462	,498 ^a
	Residual	4274701,906	155	27578,722		
	Total	4287441,083	156			

a. Predictors: (Constant), albuminuria

b. Dependent Variable: MIP1alfa urinária

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	42,019	13,702		3,067	,003	14,952	69,085
	Albuminuria	,002	,004	,055	,680	,498	-,005	,010

a. Dependent Variable: MIP1alfa urinária

APÊNDICE 8

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Pacientes com Esquistossomose Hepatoesplênica

Título do Projeto: Perfil imunológico urinário e sérico dos portadores de esquistossomose da forma hepatoesplênica passíveis de desenvolverem a glomerulopatia esquistossomótica

Pesquisadora: Alba Otoni

Introdução: Você está sendo convidado a participar de um Estudo. 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 o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Investigar marcadores de doenças renais no sangue e urina em pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose.

Resumo: A esquistossomose (xistose) é uma doença muito freqüente no Brasil e no mundo. O *Shistosoma mansoni* é o verme causador da doença no Brasil. Ele vive dentro das veias do abdome da pessoa infectada, mas seus ovos podem ir para o fígado e a própria inflamação pode comprometer outros órgãos, como, por exemplo, o rim, levando a uma doença crônica progressiva fazendo com que o paciente necessite se submeter a um tratamento complicado que substitui parcialmente as funções do rim, chamado diálise ou até mesmo o transplante de rim. Diante disso, torna-se muito importante descobrir o mais cedo possível o comprometimento renal, para que se utilize medidas de proteção antes que tenha que se tratar um rim já bastante adoecido.

Procedimentos: Para que participe do estudo você precisa ter diagnóstico esquistossomose com evidências de lesões no fígado e baço. Serão coletados: sangue (20ml) e urina de 24 horas.

Riscos: Como todo procedimento que envolve utilização de instrumentos que rompem a barreira da pele, a coleta de sangue também apresenta alguns riscos. Esses riscos podem ser genéricos comuns a todas as coletas, que são: o possível sangramento, o hematoma, dor no local da punção.

Danos: No caso de você apresentar uma reação adversa durante a realização do estudo, você deverá contactar imediatamente a Enfermeira responsável pelo estudo, Alba Otoni, pelo telefone (31) 96468397. Se ela não estiver disponível, entre em contato com algum médico da equipe do professor José Roberto Lambertucci no Hospital das Clínicas da UFMG. Se você sofrer 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 da 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 ou perda de benefícios aos quais você tem direito. 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. As despesas com transporte dentro de BH serão pagas pela equipe de médicos pesquisadores.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida, contate a Alba Otoni pelo telefone 96468397 ou o presidente da Comissão de Ética no telefone 3248-9364.

Consentimento: Eu _____ 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 9

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Pacientes Pacientes com Esquistossomose Hepatoesplênica e lesão renal

Título do Projeto: Perfil imunológico urinário e sérico dos portadores de esquistossomose da forma hepatoesplênica passíveis de desenvolverem a glomerulopatia esquistossomótica

Pesquisadora: José Roberto Lambertucci

Introdução: Você está sendo convidado a participar de um Estudo. 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 o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Investigar marcadores de doenças renais no sangue e urina em pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose.

Resumo: A esquistossomose (xistose) é uma doença muito freqüente no Brasil e no mundo. O *Shistosoma mansoni* é o verme causador da doença no Brasil. Ele vive dentro das veias do abdome da pessoa infectada, mas seus ovos podem ir para o fígado e a própria inflamação pode comprometer outros órgãos, como, por exemplo, o rim, levando a uma doença crônica progressiva fazendo com que o paciente necessite se submeter a um tratamento complicado que substitui parcialmente as funções do rim, chamado diálise ou até mesmo o transplante de rim. Diante disso, torna-se muito importante descobrir o mais cedo possível o comprometimento renal, para que se utilize medidas de proteção antes que tenha que se tratar um rim já bastante adoecido.

Procedimentos: Para que participe do estudo você precisa não ter diagnóstico de esquistossomose, e ter história de albuminúria > que 300mg/24 horas. Serão coletados: sangue (20ml) e urina de 24 horas.

Riscos: Como todo procedimento que envolve utilização de instrumentos que rompem a barreira da pele, a coleta de sangue também apresenta alguns riscos. Esses riscos podem ser genéricos comuns a todas as coletas, que são: o possível sangramento, o hematoma, dor no local da punção.

Danos: No caso de você apresentar uma reação adversa durante a realização do estudo, você deverá contactar imediatamente a Enfermeira Alba Otoni, co autora deste estudo pelo telefone (31) 96468397. Se ela não estiver disponível, entre em contato com algum médico da equipe do professor José Roberto Lambertucci no Hospital das Clínicas da UFMG. Se você sofrer 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 da 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 ou perda de benefícios aos quais você tem direito. 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. As despesas com transporte dentro de BH serão pagas pela equipe de médicos pesquisadores.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida, contate a Alba Otoni pelo telefone 96468397 ou o presidente da Comissão de Ética no telefone 3248-9364.

Consentimento: Eu _____ 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

Nome e assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE 10

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes com esquistossomose ointestinal

Titulo do Projeto: Perfil imunológico urinário e sérico dos portadores de esquistossomose da forma hepatoesplênica passíveis de desenvolverem a glomerulopatia esquistossomótica

Pesquisadora: José Roberto Lambertucci

Introdução: Você está sendo convidado a participar de um Estudo. 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 o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Investigar marcadores de doenças renais no sangue e urina em pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose.

Resumo: A esquistossomose (xistose) é uma doença muito freqüente no Brasil e no mundo. O *Shistosoma mansoni* é o verme causador da doença no Brasil. Ele vive dentro das veias do abdome da pessoa infectada, mas seus ovos podem ir para o fígado e a própria inflamação pode comprometer outros órgãos, como, por exemplo, o rim, levando a uma doença crônica progressiva fazendo com que o paciente necessite se submeter a um tratamento complicado que substitui parcialmente as funções do rim, chamado diálise ou até mesmo o transplante de rim. Diante disso, torna-se muito importante descobrir o mais cedo possível o comprometimento renal, para que se utilize medidas de proteção antes que tenha que se tratar um rim já bastante adoecido.

Procedimentos: Para que participe do estudo você precisa ter diagnóstico de esquistossomose sem comprometimento de fígado e baço. Serão coletados: sangue (20ml) e urina de 24 horas.

Riscos: Como todo procedimento que envolve utilização de instrumentos que rompem a barreira da pele, a coleta de sangue também apresenta alguns riscos. Esses riscos podem ser genéricos comuns a todas as coletas, que são: o possível sangramento, o hematoma, dor no local da punção.

Danos: No caso de você apresentar uma reação adversa durante a realização do estudo, você deverá contactar imediatamente a Enfermeira Alba Otoni, co autora deste estudo pelo telefone (31) 96468397. Se ela não estiver disponível, entre em contato com algum médico da equipe do professor José Roberto Lambertucci no Hospital das Clínicas da UFMG. Se você sofrer 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 da 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 ou perda de benefícios aos quais você tem direito. 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. As despesas com transporte dentro de BH serão pagas pela equipe de médicos pesquisadores.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida, contate a Alba Otoni pelo telefone 96468397 ou o presidente da Comissão de Ética no telefone 3248-9364.

Consentimento: Eu _____ 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

Nome e assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE 11

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Pacientes aparentemente Saudáveis.

Título do Projeto: Perfil imunológico urinário e sérico dos portadores de esquistossomose da forma hepatoesplênica passíveis de desenvolverem a glomerulopatia esquistossomótica

Pesquisador: José Roberto Lambertucci

Introdução: Você está sendo convidado a participar de um estudo. 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 o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Investigar marcadores de doenças renais no sangue e urina em pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose.

Resumo: A esquistossomose (xistose) é uma doença muito freqüente no Brasil e no mundo. O *Shistosoma mansoni* é o verme causador da doença no Brasil. Ele vive dentro das veias do abdome da pessoa infectada, mas seus ovos podem ir para o fígado e a própria inflamação pode comprometer outros órgãos, como, por exemplo, o rim, levando a uma doença crônica progressiva fazendo com que o paciente necessite se submeter a um tratamento complicado que substitui parcialmente as funções do rim, chamado diálise ou até mesmo o transplante de rim. Diante disso, torna-se muito importante descobrir o mais cedo possível o comprometimento renal, para que se utilize medidas de proteção antes que tenha que se tratar um rim já bastante adoecido.

Procedimentos: Para que participe do estudo você precisa não ter diagnóstico anterior de nenhuma doença infecciosa, renal ou esquistossomose. Serão coletados: sangue (20ml) e urina de 24 horas.

Riscos: Como todo procedimento que envolve utilização de instrumentos que rompem a barreira da pele, a coleta de sangue também apresenta alguns riscos. Esses riscos podem ser genéricos comuns a todas as coletas, que são: o possível sangramento, o hematoma, dor no local da punção.

Danos: No caso de você apresentar uma reação adversa durante a realização do estudo, você deverá contactar imediatamente a Enfermeira Alba Otoni, co autora deste estudo pelo telefone (31) 96468397. Se ela não estiver disponível, entre em contato com algum médico da equipe do professor José Roberto Lambertucci no Hospital das Clínicas da UFMG. Se você sofrer 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 da 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 ou perda de benefícios aos quais você tem direito. 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. As despesas com transporte dentro de BH serão pagas pela equipe de médicos pesquisadores.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida, contate a Alba Otoni pelo telefone 96468397 ou o presidente da Comissão de Ética no telefone 3248-9364.

Consentimento: Eu _____ 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

Nome e assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador

ANEXO 1

Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 369/08

Interessado(a): Prof. Jose Roberto Lambertucci
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 07 de outubro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Perfil imunológico e sérico de Esquistossomose da forma hepatoesplênica passíveis de desenvolverem a glomerulopatia esquistossomótica**" 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. T. Marques Amaral", is positioned above the printed name.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG