

Carolina Coimbra Marinho

**AVALIAÇÃO DA DOSAGEM SÉRICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO
COLÁGENO IV COMO MARCADORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM
PACIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
NO ESTADO DA BAHIA**

Belo Horizonte

2009

Carolina Coimbra Marinho

**AVALIAÇÃO DA DOSAGEM SÉRICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO
COLÁGENO IV COMO MARCADORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM
PACIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
NO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Lambertucci

Belo Horizonte

2009

Marinho, Carolina Coimbra.
M338a Avaliação da dosagem sérica do ácido hialurônico e do colágeno IV como marcadores de fibrose hepática em pacientes de área endêmica de Esquistossomose mansoni no estado da Bahia [manuscrito]. / Carolina Coimbra Marinho. -- Belo Horizonte: 2009.
114f.: il.
Orientador: José Roberto Lambertucci.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Esquistossomose mansoni/diagnóstico. 2. Marcadores Biológicos. 3. Ácido Hialurônico. 4. Colágeno Tipo IV. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Lambertucci, José Roberto. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 810

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Professor Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA

Professora Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Jaime Arturo Ramirez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Professor Carlos Alberto Pereira Tavares

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Professor Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Carlos Faria Santos Amaral

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÊNFASE EM INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha (coordenador)

Professor Antônio Lúcio Teixeira Júnior (subcoordenador)

Professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Professor Carlos Maurício Figueiredo Antunes

Professor José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (representante discente)



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



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: José Roberto Lambertucci, Antônio Luiz Pinho Ribeiro, Mariângela Carneiro, Cleudson Nery de Castro, Maria Cristina Chammas aprovou a defesa de tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DA DOSAGEM SÉRICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO COLÁGENO IV COMO MARCADORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO ESTADO DA BAHIA”** apresentada pela doutoranda **CAROLINA COIMBRA MARINHO** para obtenção do título de doutora em Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 15 de maio de 2009.

Prof. José Roberto Lambertucci
Orientador

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Mariângela Carneiro
Profa. Mariângela Carneiro

Prof. Cleudson Nery de Castro

Maria Cristina Chammas
Profa. Maria Cristina Chammas



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



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **CAROLINA COIMBRA MARINHO**, nº de registro 2007653766. Às quatorze horas do dia quinze do mês de maio de 2009, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: **"AVALIAÇÃO DA DOSAGEM SÉRICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO COLÁGENO IV COMO MARCADORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO ESTADO DA BAHIA"**, requisito final para a obtenção do grau de doutora em Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. José Roberto Lambertucci, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. José Roberto Lambertucci/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Antonio Luiz Pinho Ribeiro	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Mariângela Carneiro	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Cleudson Nery de Castro.	Instituição: UNB	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Maria Cristina Chammas	Instituição: USP	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada.
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de maio de 2009.

Prof. José Roberto Lambertucci/Orientador [Assinatura]

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro [Assinatura]

Prof. Mariângela Carneiro Mariângela Carneiro

Prof. Cleudson Nery de Castro [Assinatura]

Prof. Maria Cristina Chammas Maria Cristina Chammas

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha/Coordenador [Assinatura]

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

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Aos meus pais e ao João.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Roberto Lambertucci, pela dedicação sem medida.

Ao Prof. Aluizio Prata, pela oportunidade do trabalho.

Ao Prof. Carlos Mauricio Antunes, pelas valiosas intervenções.

Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior, pela realização das dosagens dos marcadores.

Ao Prof. José Carlos Serufo, pelo apoio no trabalho de campo.

Ao Laboratório Micra, pela realização das sorologias de hepatites virais.

À Dra. Raiza Ruiz-Guevara, pela colaboração.

À Dra. Luciana Cristina dos Santos Silva, pela disponibilidade e apoio na dosagem dos marcadores.

Ao Leonardo Campos de Queiroz, mestre em Infectologia e Medicina Tropical, pela realização do ultra-som durante o trabalho de campo.

A Izabela Voietta, mestre em Infectologia e Medicina Tropical, Thaís Sanai Batista, Ana Carolina Figueiredo Pereira, Rita Beatriz de Magalhães e Marina Pires Nishi, graduadas em Medicina pela UFMG, e ao aluno de Iniciação Científica Thales Bretas, pela participação indispensável nas diversas etapas deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade.”

Albert Einstein

APRESENTAÇÃO

Este trabalho partiu de um convite realizado pelo Prof. Aluízio Prata para complementar seu trabalho dedicado junto a uma população residente em área endêmica de esquistossomose. Cientista inesgotável, o Professor considerou necessário colocar à prova sua avaliação clínica e complementar as informações, armazenadas ao longo de quase trinta anos, através da realização do ultra-som, técnica reconhecidamente útil no diagnóstico das formas clínicas da esquistossomose, e cuja aplicação em áreas endêmicas tornou-se relativamente fácil após o advento dos aparelhos portáteis. Diante da inexistência deste recurso na localidade e com claros propósitos científicos, aliou-se ao Prof. Lambertucci. Conhecedor da esquistossomose e pesquisador experiente na utilização do ultra-som como ferramenta diagnóstica e de pesquisa de campo, o Prof. Lambertucci cerca-se de pessoas qualificadas para a realização do exame. Diante da mobilização programada, tornou-se oportuno avaliar o uso dos marcadores sorológicos de fibrose na área endêmica. Sua dosagem utiliza técnicas laboratoriais simples e acessíveis, amplamente difundidas na pesquisa de métodos diagnósticos para diversas afecções hepáticas fibrosantes. Uma apreciação favorável da sua utilidade no diagnóstico da hepatopatia esquistossomótica traria duplo benefício. Primeiro, somaria argumentos para sua inclusão definitiva ao arsenal do clínico para o diagnóstico da fibrose hepática. Segundo, como técnica de fácil execução em larga escala, levaria o benefício do diagnóstico ao número expressivo de pessoas que enfrentam ainda hoje a esquistossomose, entre outras mazelas, em áreas carentes de recursos materiais e humanos para o cuidado da saúde do indivíduo e das populações.

RESUMO

Marcadores bioquímicos de fibrose têm sido utilizados para prever a presença e o grau de fibrose hepática em pacientes com hepatites virais crônicas, cirrose e esquistossomose. Neste estudo, compararam-se as dosagens séricas de ácido hialurônico (AH) e colágeno IV (C-IV) com o diagnóstico da presença e grau de fibrose dado pelo ultra-som (US). Quatrocentos e onze voluntários residentes em uma área de alta endemicidade no estado da Bahia foram avaliados pelo exame físico e US. Pacientes com imagem ultra-sonográfica de cirrose, e menores de 18 anos foram excluídos. Setenta e nove indivíduos foram selecionados para a dosagem dos marcadores. O diagnóstico parasitológico foi dado pelo exame de fezes (Kato-Katz). Amostras de soro foram obtidas de todos os participantes e armazenadas a -20°C. Todos foram testados para hepatites virais B e C. O AH e o C-IV foram dosados pela técnica *ELISA* (*Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA*). O US foi realizado em todos os pacientes com o equipamento *GE Logic 100* (*GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido*), com transdutor convexo de 3,5 MHz. A definição da presença e grau de fibrose foi dada pela comparação com as pranchas esquemáticas da OMS e pela avaliação subjetiva do examinador. Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com a classificação pela OMS: fibrose ausente (A), leve (C, D, Dc), moderada (E, Ec) ou intensa (F). A avaliação subjetiva definiu a fibrose como ausente, leve, moderada e intensa. Para a comparação das concentrações dos marcadores entre os grupos de acordo com os padrões da OMS utilizou-se o método ANOVA. A acurácia do teste foi avaliada pela análise da curva ROC. As variáveis explicativas da concentração do AH foram identificadas pela análise multivariada. Seis pacientes apresentaram fibrose intensa ao US, 21 tiveram fibrose moderada e 23 fibrose leve. Vinte e nove pacientes não tinham fibrose ao US. A concentração do AH apresentou diferença significativa entre os indivíduos sem fibrose e aqueles com fibrose de qualquer grau ($p = 0,000$), e entre os pacientes com fibrose leve e intensa ($p = 0,029$). Os níveis mais elevados foram encontrados no grupo com fibrose intensa. A área sob a curva ROC (*AUC*) para o AH, de acordo com os padrões da OMS, foi 0,89 (0,82-0,97) para o diagnóstico de fibrose. Valores acima de 115,4 ng/ml identificam pacientes com fibrose [sensibilidade (S): 98%; especificidade (Es): 64%]. As variáveis relacionadas ao aumento do AH foram: idade, o grau de fibrose pela avaliação subjetiva e a presença de colaterais. Não houve diferença entre os grupos para o C-IV. O AH mostrou-se útil na identificação de pacientes com fibrose hepática esquistossomótica em áreas endêmicas.

Palavras-chave: esquistossomose; esquistossomose hepatoesplênica; ultra-som; fibrose; marcadores de fibrose.

ABSTRACT

Noninvasive markers have been used to predict the presence and degree of liver fibrosis in chronic viral hepatitis, cirrhosis and schistosomiasis. This study was designed to compare serum levels of hyaluronic acid (HA) and collagen IV (C-IV) to ultrasonographic diagnosis of liver fibrosis. 411 subjects from a highly endemic area for schistosomiasis in the Bahia state, in Brazil, have been submitted to clinical and ultrasound (US) examinations. Subjects younger than 18 and those with an ultrasound diagnosis of cirrhosis were not eligible. Seventy nine subjects were selected for evaluation of fibrosis markers. *S. mansoni* ova were sought in the stools using the Kato-Katz technique. Serum samples obtained from all participants were stored at -20°C. All patients were tested for viral hepatitis B and C. HA and C-IV serum levels were measured by an ELISA technique (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA). US examination was performed in all patients using the GE Logic 100 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), equipment with a 3.5 MHz convex transducer. Definition of presence and grade of fibrosis were based on WHO patterns for US and on the examiner's subjective evaluation of the fibrosis. Patients were separated according to WHO patterns in four groups: no fibrosis (A), light fibrosis (C, D, Dc), moderate fibrosis (E, Ec) or intense fibrosis (F). Fibrosis was defined by subjective evaluation as absent, light, moderate or intense. Comparison of serum levels between groups of fibrosis were conducted through the analysis of variances (ANOVA). Test accuracy was evaluated through the Receiver Operator Characteristic (ROC) curve analysis. Independent predictors of HA concentration were determined by multiple regression modeling. 6 patients had intense liver fibrosis on ultrasound examination, 21 had moderate and 23 had light fibrosis; 29 individuals did not have fibrosis. HA levels reached statistically significant difference between subjects with and without fibrosis ($p=0.000$), and between those with light and intense fibrosis ($p=0.029$). Highest levels were detected in the intense fibrosis group. The area under the ROC curve (AUC) was 0.89 (0.82-0.97) for liver fibrosis. Values above 115.4 ng/ml disclosed patients with fibrosis [sensitivity (Se): 98%; specificity (Sp): 64%]. Independent predictors of HA concentration were intensity of fibrosis on subjective evaluation, age and collateral circulation. There was no difference in C-IV values between study groups. Serum HA was useful in diagnosing patients with liver fibrosis in endemic areas for schistosomiasis mansoni with high diagnostic accuracy.

Key-words: schistosomiasis; hepatosplenic schistosomiasis; ultrasound; fibrosis; fibrosis markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras		Pág.
Figura 1 -	Foto tirada por satélite da localização de Santa Maria da Vitória. Fonte: IBGE, 2005.....	48
Figura 2 -	Fluxograma da amostragem dos pacientes.....	53
Figura 3 -	Palpação do fígado. A. Prof. Aluízio Prata. B. Prof. José Roberto Lambertucci.....	55
Figura 4 -	A. Criança portadora de hepatoesplenomegalia, segundo o exame físico. B. Paciente portador de hepatoesplenomegalia, segundo o exame físico. C. Paciente esplenectomizado portador de hepatomegalia, segundo o exame físico.....	55
Figura 5 -	Realização do exame ultra-sonográfico.....	56
 Gráficos		
Gráfico 1 -	Concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde.....	65
Gráfico 2 -	Curva <i>ROC</i> : ácido hialurônico. <i>AUC</i> : 0,89 (IC 95% 0,82 - 0,97).....	66
Gráfico 3 -	Concentração do colágeno IV de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde.....	67
Gráfico 4 -	Diagnóstico de fibrose à ultra-sonografia. A. Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). B. Distribuição dos pacientes divididos em quatro grupos de acordo com a classificação da OMS. C. Distribuição dos pacientes de acordo com a avaliação subjetiva da fibrose.....	97
Gráfico 5 -	A. Distribuição da variável ácido hialurônico. B. Distribuição da variável ácido hialurônico após transformação logarítmica.....	98
Gráfico 6 -	Concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação subjetiva da fibrose pelo ultra-som.....	100
Gráfico 7 -	Curva <i>ROC</i> : ácido hialurônico na classificação subjetiva da fibrose pelo ultra-som. <i>AUC</i> : 0,91 (IC 95% 0,84 - 0,98).....	101
Gráfico 8 -	Curva <i>ROC</i> : ácido hialurônico. A. Veia porta. B. Diâmetro do baço. C. Circulação colateral.....	105

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas da amostra de 79 indivíduos selecionada para a realização da dosagem dos marcadores de fibrose em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004.....	62
Tabela 2 - Características ultra-sonográficas dos 79 indivíduos selecionados para a realização da dosagem dos marcadores de fibrose em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004.....	63
Tabela 3 - Concordância entre os métodos de avaliação ultra-sonográfica da fibrose hepática, pelos padrões da Organização Mundial de Saúde e subjetivo, em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004.....	64
Tabela 4 - Comparação das medianas da concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde.....	65
Tabela 5 - Comparação das médias das concentrações do colágeno IV de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde.....	67
Tabela 6 - Coeficientes de correlação (r) das variáveis do estudo com a concentração do ácido hialurônico.....	69
Tabela 7 - Variáveis explicativas da variação da concentração do ácido hialurônico nos portadores de fibrose, em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004.....	70
Tabela 8 - Comparação das médias das concentrações do ácido hialurônico e do colágeno IV de acordo com o diagnóstico clínico e ultra-sonográfico de hipertensão portal.....	71
Tabela 9 - Coordenadas da curva ROC para o ácido hialurônico no diagnóstico da fibrose pelo padrão da Organização Mundial de Saúde.....	98
Tabela 10 - Comparação das medianas da concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação subjetiva da fibrose, usando o teste ANOVA.....	100
Tabela 11 - Coordenadas da curva ROC para o ácido hialurônico no diagnóstico subjetivo da fibrose pelo ultra-som.....	101
Tabela 12 - Comparação das médias da concentração do colágeno IV de acordo com a classificação subjetiva da fibrose, usando o teste ANOVA.....	103
Tabela 13 - Comparação das médias do calibre da veia porta de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde.....	103

Tabela 14 -	Comparação das medianas do calibre da veia esplênica de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde.....	103
Tabela 15 -	Comparação das medianas do calibre da veia mesentérica superior de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde	104
Tabela 16 -	Comparação das medianas do diâmetro longitudinal do baço de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde.....	104
Tabela 17 -	Análise de regressão múltipla para a concentração do ácido hialurônico	105
Tabela 18 -	Acurácia diagnóstica do ácido hialurônico para a fibrose e hipertensão portal.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
ANOVA	Análise de variância
Anti-HBc	Anticorpos contra o antígeno <i>core</i> do vírus da hepatite B
Anti-VHC	Anticorpos contra o vírus da hepatite C
Arg-1	arginase
ASO	Antígeno solúvel do ovo
AST	Aspartato transpeptidase
ATP	Trifosfato de adenosina
AUC	<i>Area under the receiver operating curve</i>
C-IV	Colágeno IV (<i>Collagen IV</i>)
CSF	Fator estimulador de colônias
dp	desvio padrão
EGF	Fator de crescimento do endotélio
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPF	Exame parasitológico de fezes
Es	Especificidade
ET	Endotelina
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GE	<i>General Electric</i>
gl	Grau de liberdade
HA	<i>Hyaluronic acid</i>
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
IBGE	Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina

IMC	Índice de massa corporal (peso/altura ²)
INF	Interferon
LDH	Desidrogenase láctica
Ln	Logaritmo neperiano
MCP	Peptídeo quimiotático de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MHz	megaHerz
MMP	Metaloproteinases
<i>NK</i>	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIIIP	Peptídeo procolágeno tipo III
PCP	Pró-peptídeo C do colágeno IV
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PSCO	Prova de precipitação periovular
RM	Ressonância magnética
<i>RNS</i>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<i>ROC</i>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>
S	Sensibilidade
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
<i>SPSS</i>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TC	Tomografia computadorizada
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i> (fator de transformação do crescimento)
<i>Th 1/2</i>	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1/2
TIMP	Inibidor tecidual das metaloproteinases
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
US	Ultra-som (<i>ultrasound</i>)
VHC	Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Diagnóstico da esquistossomose hepatoesplênica	23
2.2 Morfologia da lesão hepática	29
2.3 Imunologia da lesão hepática	30
2.4 Fibrogênese	34
2.5 Ácido hialurônico	37
2.6 Colágeno IV	40
2.7 Marcadores de fibrose e esquistossomose	42
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 PACIENTES E MÉTODOS	50
4.1 Histórico	50
4.1.1 ÁREA DE ESTUDO.....	50
4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENDEMICIA.....	51
4.2 Pacientes	52
4.2.1 CENSO POPULACIONAL.....	52
4.2.2 AMOSTRA.....	52
4.3 Métodos	55
4.3.1 EXAME CLÍNICO.....	55
4.3.2 ULTRA-SOM.....	57
4.3.3 DOSAGEM DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO COLÁGENO IV.....	58
4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4.4 Considerações éticas	61
4.5 Revisão bibliográfica	62
5 RESULTADOS	63
5.1 Caracterização da amostra	63

5.2	Ácido hialurônico.....	65
5.3	Colágeno IV.....	67
5.4	Análise das variáveis relacionadas à concentração do ácido hialurônico.....	69
5.5	Comparação dos marcadores de fibrose com sinais clínicos e ultrasonográficos de hipertensão portal.....	71
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÕES.....	80
8	PROPOSIÇÕES.....	81
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	APÊNDICE.....	97
	ANEXOS.....	107

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença milenar. Estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por ela atualmente, e que outras 600 milhões encontrem-se sob risco de infecção. A doença distribui-se endemicamente em mais de 70 países na África, América e Ásia (COURA; AMARAL, 2004). No Brasil, estima-se que quatro a seis milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Schistosoma mansoni*. Cerca de 70% dos casos estão concentrados nos estados de Minas Gerais e Bahia (DRUMMOND *et al.*, 2006).

Sistemas de informação geográfica têm sido utilizados para estudar a dinâmica espaço-temporal da distribuição da esquistossomose. No Brasil, estudos realizados na Bahia (BAVIA *et al.*, 2001) e em Minas Gerais (GUIMARÃES *et al.*, 2006) possibilitaram a elaboração de mapas de risco estabelecendo as relações entre a prevalência da doença e diversas variáveis sócio-ambientais, como a distribuição das vegetações, variações da temperatura e umidade, densidade e desenvolvimento populacional. Verifica-se atualmente a ampliação de sua área de abrangência no Brasil.

A cercária é a forma infectante do *S. mansoni*. Dentro da água, ao encontrar o hospedeiro, ela penetra através da pele e migra pela corrente sanguínea através dos pulmões, enquanto se desenvolve, até se instalar preferencialmente no sistema venoso mesentérico humano. Ao término do período de maturação de 4 a 6 semanas, o trematódeo digenético inicia seu ciclo reprodutivo sexuado com a postura de ovos pela fêmea (GRYSSELS *et al.*, 2006).

As lesões determinantes da morbidade na infecção crônica não se devem aos vermes adultos, mas aos ovos impactados nos tecidos durante a migração, ou por embolização. Tipicamente, os ovos são direcionados pelo fluxo sanguíneo porta para o fígado, ou atingem localizações ectópicas como os pulmões, o sistema nervoso central e o aparelho geniturinário. Os ovos secretam enzimas proteolíticas causadoras de reação inflamatória granulomatosa, que é progressivamente substituída por tecido fibrótico (GRYSSELS *et al.*, 2006).

O acometimento inflamatório do fígado ocorre precocemente na infecção. Pode provocar hepatoesplenomegalia, majoritariamente em crianças e adolescentes. Nesta fase, o ultra-som evidencia aumento inespecífico do baço e do fígado, podendo identificar também linfadenomegalia abdominal (BARATA; PINTO-SILVA; LAMBERTUCCI, 1999).

A forma hepatoesplênica da esquistossomose se desenvolve ao longo de cinco a 15 anos, em indivíduos cronicamente expostos a infecção intensa, e com provável predisposição imunogenética. Caracteriza-se classicamente pela hepatoesplenomegalia, hipertensão portal verificada pela presença de varizes esofagianas ou gástricas, e pelo hiperesplenismo, identificado pelas citopenias de graus variados. Até as fases mais tardias da doença observa-se a preservação da função do hepatócito. A lesão histológica é o resultado da impactação crônica de numerosos ovos, gerando reação inflamatória granulomatosa e a obliteração intra-hepática dos ramos portais, seguida de deposição acentuada de fibras colágenas nos espaços periportais. O substrato anatômico dessa apresentação clínica é a formação de placas de fibrose em substituição aos componentes dos espaços portais, com considerável preservação da arquitetura parenquimatosa (ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997; ANDRADE, 2004; BOGLIOLO, 1957; LAMBERTUCCI *et al.*, 2001a; SYMMERS, 1904). Resultam da oclusão progressiva do sistema venoso portal, o desenvolvimento de hipertensão portal e suas complicações – esplenomegalia, abertura de circulação colateral, varizes esofagianas e, eventualmente, morte por hemorragia digestiva.

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

Estudos de anatomia patológica já haviam demonstrado a ocorrência de fibrose hepática em pacientes com baço de tamanho normal (ANDRADE; BINA, 1983; PRATA; ANDRADE, 1963). De forma semelhante, já foi demonstrada discordância entre imagens ecográficas sugestivas de fibrose hepática em pacientes sem visceromegalias, ou imagens sem espessamento periportal e com visceromegalias ao exame físico (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001a). Somada a essas observações, a baixa sensibilidade do exame físico na apreciação do aumento dos órgãos abdominais coloca em dúvida a acurácia da classificação puramente clínica da morbidade da esquistossomose (MARINHO *et al.*, 2006).

O valor do ultra-som de abdome na identificação da doença avançada e sua aplicação no rastreamento de populações em áreas endêmicas para esquistossomose foi amplamente estabelecido (RICHTER, 2000). Entretanto, a identificação precoce de indivíduos com estágios iniciais da fibrose hepática da esquistossomose permanece em questão.

Métodos propedêuticos ideais, de baixo custo, fácil execução e alta precisão diagnóstica, somariam informações valiosas ao diagnóstico e avanços no tratamento e planejamento de saúde em áreas ainda acometidas pela esquistossomose (KARDORFF *et al.*, 1999).

A fibrose, considerada até recentemente um processo definitivo, é hoje compreendida como desequilíbrio entre a deposição e a degradação dos componentes da matriz extracelular, dependente da presença de fatores agressores ao tecido em questão (GRIMAUD, 1987). A dosagem sorológica de marcadores do metabolismo do tecido conjuntivo tem sido utilizada como indicador de fibrose em diferentes patologias hepáticas (STONE, 2000). Entretanto, sua capacidade de detectar o acometimento hepático e a evolução da fibrose na esquistossomose, quando aplicados em áreas endêmicas, carecem de elucidação.

Neste estudo, compara-se a dosagem de marcadores não invasivos de fibrose com o método indireto atualmente utilizado como padrão-ouro no diagnóstico da fibrose hepática esquistossomótica, o ultra-som. O objetivo é avaliar a acurácia dos marcadores para o diagnóstico da fibrose e sua utilidade no rastreamento dos indivíduos portadores do acometimento hepático em áreas endêmicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diagnóstico da esquistossomose hepatoesplênica

A morbidade causada pela esquistossomose em áreas endêmicas é habitualmente avaliada através do percentual de indivíduos com mais de cinco anos de idade portadores da forma hepatoesplênica. Esta forma crônica grave é caracterizada pela presença de fibrose hepática periportal. Observada exclusivamente em indivíduos com exposição repetida aos focos de infecção, pode levar de 5 a 15 anos após o contato inicial para se desenvolver. A forma hepatoesplênica é mais freqüente em áreas de maior prevalência, em indivíduos mais jovens e com maiores cargas parasitárias. Também é freqüente o acometimento de vários indivíduos da mesma família (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001b; PRATA, 2004).

A definição da forma hepatoesplênica constitui uma questão em aberto. Esta forma é facilmente reconhecida em pacientes residentes em áreas endêmicas, com evidência laboratorial da infecção esquistossomótica, que apresentem o baço volumoso e o fígado de consistência endurecida e com aumento do lobo esquerdo à palpação abdominal (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001b; PRATA, 2004). No entanto, existem numerosas evidências da imprecisão da classificação puramente clínica da esquistossomose.

Estudos de necropsias de pacientes portadores de esquistossomose mansônica revelam casos de fibrose hepática periportal de Symmers com o baço de volume normal (ANDRADE; BINA, 1983; PRATA; ANDRADE, 1963).

Com relação à avaliação dos órgãos abdominais, as limitações da palpação abdominal na identificação do aumento do baço e fígado têm sido reiteradamente evidenciadas pela comparação com métodos de diagnóstico por imagem.

Sullivan e Williams (1976) compararam a palpação e a percussão esplênica com a medida do órgão pela cintilografia para a identificação do aumento do baço. Os autores encontraram alta sensibilidade (88%) da palpação abdominal para a esplenomegalia, mas em 10,5% dos casos o aumento do baço detectado pelo exame físico não foi confirmado pela cintilografia.

A confiabilidade do exame clínico em comparação com o ultra-som na avaliação da esplenomegalia também foi avaliada por Barkun *et al.* (1991). Os autores sugeriram a combinação

das técnicas de exame físico – palpação e percussão do espaço de Traube, em seqüência – para a identificação do aumento do baço. Contudo, destacou-se que mesmo os melhores resultados freqüentemente não excluem a necessidade do exame de imagem para o planejamento terapêutico.

A determinação da forma clínica da esquistossomose pela palpação do baço foi avaliada em comparação com a medida do órgão pela ultra-sonografia, em um estudo de campo realizado em área endêmica para esquistossomose (GESPARCER-LARA *et al.*, 1998). Os autores encontraram baixa sensibilidade e baixo valor preditivo positivo (72,2 e 35,1%, respectivamente) para a palpação abdominal no diagnóstico de esplenomegalia em pacientes com mais de 17 anos. Ainda que melhor especificidade e valor preditivo negativo (90,5 e 97,8%, respectivamente) tenham sido encontrados, a palpação foi considerada pelos autores insuficiente para a exclusão da esplenomegalia pelo exame físico.

Em busca de indicadores clínicos, laboratoriais e ultra-sonográficos para a avaliação da morbidade da esquistossomose mansônica em crianças, Hassan *et al.* (1999) compararam os resultados do diagnóstico sorológico por *ELISA*, carga parasitária, palpação abdominal e ultra-sonografia. Em relação à classificação puramente clínica, os autores destacaram a falta de correlação entre o exame clínico e a ultra-sonografia na definição das formas clínicas e atribuíram este fato à baixa confiabilidade do exame clínico na identificação do aumento do baço.

Na avaliação do fígado, a palpação abdominal realizada independentemente por três médicos com tempo de experiência variável (um a 8 anos) foi comparada de forma mascarada com a medida do fígado ao ultra-som, em um estudo hospitalar na Índia. Em 20% dos pacientes o fígado era aumentado quando medido pelo ultra-som. A correlação entre cada examinador e o exame ultra-sonográfico foi baixa, assim como a concordância entre os examinadores quanto à palpação e percussão do fígado (RAJNISH *et al.*, 2004).

Dados obtidos durante a realização do presente estudo foram também analisados quanto à precisão do diagnóstico clínico da hepatoesplenomegalia. Novamente foi demonstrada a baixa confiabilidade do exame físico para o diagnóstico do aumento dos órgãos abdominais, e confirmada a necessidade do uso de método complementar para a classificação dos pacientes com esquistossomose. A utilização do ultra-som permite, além de realizar a medida dos órgãos abdominais, avaliar alterações da textura do parênquima hepático, pesquisar o desenvolvimento de circulação colateral hepatofuga e diagnosticar ou excluir outras patologias abdominais (MARINHO *et al.*, 2006).

Estabelecida a importância do exame de imagem na correta identificação do aumento dos órgãos abdominais, ainda é necessário verificar o diagnóstico da fibrose do fígado. O exame físico também é incapaz de apontar a existência da fibrose periportal.

A biópsia hepática em cunha é o método considerado mais preciso para o diagnóstico da fibrose periportal de Symmers (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1989, 1992). Contudo, é desejável a identificação dessa alteração anatômica de modo não invasivo, e os métodos complementares indiretos têm sido intensamente investigados. O primeiro registro da utilização da ultra-sonografia no diagnóstico da fibrose hepática na esquistossomose data da década de 70 (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1978). As imagens do parênquima hepático foram comparadas repetidas vezes com resultados de biópsias e a excelente correlação entre os métodos colocou o ultra-som em posição de destaque como método não invasivo e de alta confiabilidade no diagnóstico da fibrose de Symmers (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1989; HOMEIDA *et al.*, 1988).

Em estudo prospectivo, Homeida *et al.* (1988) compararam o US abdominal com a biópsia hepática para o diagnóstico de fibrose de Symmers. Indivíduos portadores de hipertensão portal com complicações hemorrágicas, incluídos em protocolos de tratamento cirúrgico, foram examinados. Quarenta e um pacientes foram submetidos à biópsia, sendo 35 em cunha e seis biópsias por agulha. Vinte e oito tiveram diagnóstico histológico de fibrose de Symmers. A intensidade da fibrose também foi avaliada, utilizando-se uma graduação ultra-sonográfica comparada com a graduação histológica, ambas em escala progressiva de grau I a IV. A hiperecogenicidade periportal descrita antes da cirurgia nos 28 casos foi confirmada pelo achado de fibrose de Symmers à histologia. Esse sinal ultra-sonográfico estava ausente em todos os 10 casos que não receberam diagnóstico histológico de fibrose (sensibilidade e especificidade de 100%). No entanto, dois eventos podem ter induzido a uma estimativa excessivamente otimista da precisão diagnóstica do US nesse estudo. Primeiro, em 25 casos o diagnóstico de fibrose de Symmers foi confirmado por dois patologistas, mas em três dos 28 casos o diagnóstico foi dado por apenas um examinador. Segundo, outros três pacientes, cujo diagnóstico histológico permaneceu indefinido, não foram incluídos na análise. Finalmente, não houve correlação entre a intensidade da ecogenicidade periportal e a graduação histológica da fibrose.

Em outro estudo prospectivo, 50 pacientes foram submetidos a exame ultra-sonográfico e, em seguida, à cirurgia para tratamento de hipertensão portal com complicações hemorrágicas, de diferentes etiologias. A biópsia em cunha do lobo hepático esquerdo foi obtida de todos os pacientes durante a cirurgia. Dois patologistas examinaram todas as biópsias e concordaram em

49 casos. Dezenove pacientes tiveram o diagnóstico histológico de fibrose periportal esquistossomótica. Entre esses, 16 haviam apresentado aumento da ecogenicidade periportal ao US, correspondendo a uma sensibilidade de 84%. Dezenove pacientes receberam diagnóstico histológico de cirrose, 11 tiveram associação de anormalidades e um não teve diagnóstico definido. Entre eles, o US detectou espessamento ecogênico periportal em apenas um paciente portador de anormalidades combinadas e um paciente sem definição diagnóstica pela histologia, correspondendo a uma especificidade de 93% (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1989).

O uso do ultra-som na esquistossomose foi avaliado com grande otimismo a partir da década de 90, tendo sido considerado o método mais próximo do ideal no diagnóstico da doença (ABDEL-WAHAB; STRICKLAND, 1993; KARIUKI *et al.*, 2001). Tendo-se apresentado consistentemente como método de simples aplicação, seguro e de baixo custo, esse método indireto representa atualmente uma importante ferramenta para o diagnóstico e classificação da forma clínica da doença. A disponibilidade de aparelhos portáteis de ultra-som abriu nova perspectiva para o estudo das populações residentes em áreas endêmicas (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1992; COTA *et al.*, 2006; DOEHRINGER-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1989; LAMBERTUCCI *et al.* 2001a; MARINHO *et al.*, 2006; RICHTER *et al.*, 1992a; 1992b; 2000).

A morbidade relacionada à esquistossomose em uma área de alta endemicidade em Minas Gerais foi descrita por Lambertucci *et al.*, em 1996. Em seguida, foi sugerida a adoção de uma combinação de dados clínicos e ultra-sonográficos para a classificação das formas clínicas naquelas áreas. Quatro diferentes grupos foram identificados na população estudada, com base nos achados clínicos em combinação com a ultra-sonografia: um grupo com o baço palpável e intenso espessamento periportal ao ultra-som, um grupo com o baço não palpável e intenso espessamento periportal, um grupo com o baço palpável e espessamento leve a moderado ao ultra-som e finalmente um grupo com o baço palpável e o fígado normal (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001a).

Questiona-se, novamente, a classificação da forma hepatoesplênica baseada puramente no exame clínico, já que existem pacientes com o baço aumentado e fígado de aparência normal à ultra-sonografia, ainda que o exame de fezes seja positivo para *S. mansoni*, e pacientes com alterações hepáticas, mas com baço de tamanho normal ou não palpável (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000; 2004; MARINHO *et al.*, 2006; PRATA; ANDRADE, 1963).

Crítérios ultra-sonográficos capazes de identificar e classificar os sinais de morbidade relacionados com a esquistossomose hepatoesplênica, como a presença e extensão da fibrose hepática, sinais de aumento da pressão no sistema porta, formação de circulação colateral, espessamento da parede da vesícula biliar e aumento dos órgãos abdominais, foram desenvolvidos em uma série de investigações e são hoje adotados e recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (DOEHRINGER-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1989; GESPARCHER-LARA *et al.*, 1997; HOMEIDA *et al.*, 1988; PINTO-SILVA *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 2001).

Em 2000, a OMS produziu um conjunto de diretrizes para a avaliação ultra-sonográfica da esquistossomose, trazendo uniformidade para sua aplicação tanto no diagnóstico clínico quanto na investigação científica (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). Nessa publicação encontram-se definidos os cortes para avaliação ultra-sonográfica do fígado, os padrões esquemáticos de imagem hepática ultra-sonográfica (ANEXO 6), a metodologia para a medida do diâmetro dos ramos portais de segunda ordem e a organometria dos lobos direito e esquerdo do fígado, baço, diâmetro interno da veia porta e espessura da parede dos ramos secundários da veia porta. Aspectos qualitativos da textura hepática nas regiões periportais e as variáveis quantitativas, como calibre de vasos e espessura de suas paredes (ramos subsegmentares da veia porta), foram utilizados para a classificação da morbidade ultra-sonográfica da doença.

Um avanço promissor na tecnologia da ultra-sonografia é a análise de ondas elásticas de baixa frequência através de sondas apropriadas. A aceleração da velocidade das ondas pela perda de elasticidade do tecido hepático produz padrões compatíveis com o diagnóstico de cirrose (CASTERA; XAVIER; ALFREDO, 2008; SANDRIN *et al.*, 2003). O método tem sido aplicado ao estudo de diversas patologias hepáticas fibrosantes, mas ainda não se encontram na literatura estudos da fibrose de etiologia esquistossomótica utilizando a elastografia transitória.

Poucos estudos utilizaram a tomografia computadorizada (TC) na avaliação da forma hepatoesplênica da esquistossomose. Um grupo de pesquisadores descreveu imagens obtidas por tomografia computadorizada abdominal de cinco pacientes com evidência de fibrose periportal pelo US. Três desses pacientes tiveram confirmação histológica do diagnóstico de esquistossomose. De acordo com a descrição, áreas de hipodensidade periportal sofreram contrastação após a injeção de meio iodado, atingindo densidade máxima após 60 segundos. As imagens podem formar faixas ou anéis em torno dos ramos maiores da veia porta (FATAAR *et al.*, 1985; MANZELLA *et al.*, 2007). No entanto, as imagens de hipodensidade periportal passíveis de acentuação por meio de contraste são inespecíficas, tendo sido descritas também em

portadores de sarcoma de Kaposi hepático na SIDA e após o tratamento quimioterápico para diferentes doenças neoplásicas (HAMMERMAN; KOTNER; DOYLE, 1991). Além disso, soma-se à exposição obrigatória dos pacientes à irradiação, o risco de reações alérgicas imprevistas na injeção de contraste.

A ressonância magnética (RM) tem se mostrado um método de imagem promissor na avaliação dos portadores de esquistossomose. Em 1995, sua utilização para o diagnóstico de um paciente portador de fibrose hepática esquistossomótica foi descrita pela primeira vez. A fibrose periportal produz faixas de sinal hipo ou isoíntenso em imagens ponderadas em T1, e de alta intensidade nas imagens em T2 (MANZELLA *et al.*, 2007; WILLEMSSEN *et al.*, 1995). É um exame com baixa variação intra e inter observadores para sua leitura, ao contrário do ultra-som (LAMBERTUCCI; ANDRADE; PINTO-SILVA, 2002; LAMBERTUCCI *et al.*, 2004). Silva, L. C. *et al.* (2006) apontaram uma discordância importante entre as imagens ultra-sonográficas e de RM. Em um caso relatado, imagens previamente atribuídas à fibrose pelo US revelaram, à RM, a presença inequívoca de tecido adiposo após a supressão eletrônica do sinal emitido por esse tecido. Posteriormente, Silva, L. C. (2007) comparou a ultra-sonografia e a RM em estudo sobre a morbidade na esquistossomose mansônica e demonstrou a importância do uso desse método nos casos de fibrose periportal classificada como exclusivamente central pelo ultra-som em paciente sem evidência de hipertensão portal. A comparação da RM com o US e com a biópsia hepática em 14 pacientes mostrou boa concordância entre os métodos na identificação da presença da fibrose em 14 pacientes graves, com indicação de tratamento cirúrgico da hipertensão portal. No entanto, o US falhou em identificar um caso (TEIXEIRA, 2007). Digna de nota, porém, foi a baixa concordância entre os métodos quanto à classificação da intensidade da fibrose.

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

2.2 Morfologia da lesão hepática

O granuloma. A reação granulomatosa é um processo inflamatório crônico focal, compacto e organizado, que se desenvolve em estágios de maturação e involução. Sua formação na esquistossomose é induzida pelo processo extracelular de deposição de ovos nos ramos intra-hepáticos da veia porta. A fase inicial, ou pré-granulomatosa, é de intensa reação periovular. Ocorre o extravasamento do ovo para o espaço periportal, com intensa exsudação e lise tecidual, capaz de abrir o espaço esférico que será ocupado pela lesão organizada. Células inflamatórias com maior capacidade adesiva migram em direção centrípeta. Forma-se assim a camada mais interna do granuloma, rica em células CD44+, orquestradas por um complexo conjunto de fatores de transcrição, citocinas, e moléculas de adesão. Observa-se, no centro do granuloma, uma zona clara contendo macrófagos/monócitos, que podem formar células sinciciais gigantes. Em seguida, inicia-se a maturação do granuloma. Durante esta fase, ocorre a deposição dos componentes da matriz extracelular. Inicialmente verifica-se o predomínio de fibras de colágeno tipo III, irradiadas a partir de pontos de ancoragem que correspondem às células secretoras dos componentes da matriz, os fibroblastos e miofibroblastos. As fibras organizam-se em uma verdadeira malha, às vezes com o aspecto de uma colméia, compondo a camada intermediária do granuloma, imediatamente externa à zona clara central. Essa organização obedece, possivelmente, a um equilíbrio entre as linhas de força de adesão e tensão do parênquima circunjacente. Nas fases finais de maturação, ocorre a substituição do colágeno tipo III por fibras do tipo I. Estas fibras assumem uma compacta orientação concêntrica. Externamente, observam-se células hematopoiéticas nas fases iniciais do granuloma hepático e nas fases mais tardias, linfócitos e plasmócitos (LENZI *et al.*, 1998; 1999).

Os vasos sanguíneos. As alterações vasculares recebem destaque nas investigações sobre a patogenia da fibrose periportal esquistossomótica. Um estudo de necropsias (LICHTENBERG, 1955) descreve a histologia das lesões dos ramos portais intra-hepáticos. O autor observa um caráter evolutivo, iniciado com a destruição dos vasos e sua substituição pelos granulomas, seguida de esclerose e estreitamento dos vasos remanescentes pela infiltração de tecido fibroso. Finalmente, ocorre trombose e inflamação vascular que se estende até os ramos de calibre progressivamente maior. Estudos posteriores utilizaram a moldagem plástica dos leitos vasculares hepáticos, seguida de corrosão ácida dos tecidos, para demonstrar a formação de intensa rede de pequenos vasos portais colaterais tortuosos, ora com pontos de dilatação, ora com estreitamento luminal. Estes novos vasos foram descritos como formações angiomasas, localizadas em contigüidade com ramos subitamente interrompidos. Estas alterações são atribuídas à elevação da

pressão decorrente da obstrução das vênulas por grande número de ovos. A abertura de novos canais aumenta as possibilidades de distribuição desses ovos. Uma acentuada hiperplasia e hipertrofia do leito arterial é o outro aspecto importante da patologia vascular hepática da esquistossomose, verificado pelo método de moldagem-corrosão. Este fenômeno, provavelmente compensatório da perda progressiva da permeabilidade venular portal, torna o parênquima hepático profundamente dependente do suprimento sanguíneo arterial e susceptível à injúria por isquemia (BOGLIOLO, 1957; ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997; ANDRADE, 2004).

A estrutura lobular hepática é habitualmente preservada e somente se altera na esquistossomose depois de estabelecida a arterialização da circulação hepática. Podem-se observar, a partir daí, áreas de necrose focal e regeneração nodular em consequência de episódios de interrupção ou redução do suprimento sanguíneo arterial, como trombose intra-hepática ou choque hemorrágico (ANDRADE, 2004; SILVA L. M. *et al.*, 2006). A consequência clínica é a manifestação de alterações funcionais do fígado.

O espaço de Disse. A interface onde ocorrem as trocas de substâncias entre o hepatócito e o sangue no fígado humano, o espaço de Disse, também sofre modificações na esquistossomose crônica. Modificações estas decorrentes da presença de substâncias antigênicas ou tóxicas originadas do ovo, dos vermes adultos, ou conduzidas ao fígado pelo fluxo sanguíneo arterial. A camada endotelial torna-se contínua, pobremente fenestrada. Perde-se sua organização linear, podendo o endotélio constituir-se de até três camadas de células. Observa-se uma fina lâmina basal, contínua e regular, subjacente a cada camada celular. Também abundantes são as células de Kupffer no interior dos sinusóides ou sobre a linha endotelial. Os microvilos típicos do pólo vascular dos hepatócitos são substituídos por projeções citoplasmáticas irregulares, por vezes tão extensas que podem infiltrar-se entre as células endoteliais até atingir o lúmen sinusoidal e, ocasionalmente, desprender-se. Soma-se às alterações dos componentes do espaço de Disse, o seu espessamento secundário à deposição de fibras colágenas, dispersas e isoladas ou em feixes espessos (GRIMAUD; BOROJEVIC, 1977).

2.3 Imunologia da lesão hepática

O evento patogênico central da esquistossomose é a formação do granuloma. Com ele sobrevém a destruição tecidual localizada do espaço porta, obstrução ao fluxo sanguíneo, elevação da pressão portal e fibrose do espaço periportal. No entanto, a relação entre a regulação do tamanho dos granulomas e a cinética de deposição do colágeno é ainda desconhecida (CHEEVER, 1997).

A infecção esquistossomótica aguda pode manifestar-se com febre, astenia, sintomas gastrintestinais, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e eosinofilia, de 3 a 6 semanas depois da exposição, especialmente na ocasião do primeiro contato com o parasita (LAMBERTUCCI *et al.*, 1997). Essa manifestação exuberante associa-se a granulomas grandes e floridos, e os sintomas podem relacionar-se aos níveis do fator de necrose tumoral α (*TNF- α*) ou a imunocomplexos circulantes (WYNN *et al.*, 2004).

Presume-se que o granuloma represente uma solução evolutiva conciliadora para a sobrevivência do hospedeiro e do parasita. Ao conter a disseminação dos elementos antigênicos do ovo e a intensa reação inflamatória correspondente, o granuloma protege o hospedeiro e permite a sobrevivência prolongada do parasita (LENZI *et al.*, 1998; WYNN *et al.*, 2004). A formação de espécies reativas de oxigênio (*ROS*) e as peroxidases originadas nas células inflamatórias contribuem para a destruição dos ovos, e as fibras colágenas organizadas ao redor do granuloma impedem a difusão tecidual de antígenos hepatotóxicos presentes nos ovos. Entretanto, imediatamente antes da impactação do ovo e formação do granuloma, os antígenos se difundem livremente no sistema microvascular hepático e podem ativar células endoteliais e estreladas, passo inicial para a formação da fibrose periportal (HANNA *et al.*, 2005).

O linfócito T *helper* CD4+ tipo 2 (Th2) é a célula fundamental na formação do granuloma esquistossomótico. Na esquistossomose, como em outras parasitoses, o hospedeiro é exposto a diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, ou seja, a diversos conjuntos de antígenos. Em consequência, a resposta granulomatosa evolui de uma resposta precoce do tipo 1 para uma resposta sustentada e dominante do tipo 2 por mecanismos ainda não totalmente elucidados.

A resposta do tipo 1 constitui a primeira linha de defesa contra microorganismos intracelulares. A célula característica desta resposta é o linfócito T *helper* tipo 1 (Th1) e as principais citocinas envolvidas são a interleucina-12 (IL-12) e o interferon- γ (INF- γ). Seus mecanismos efetores compreendem a ativação da atividade microbicida dos macrófagos, opsonização e fagocitose de partículas microbianas, e a destruição de células fagocíticas infectadas pelos linfócitos T CD8+. Resultam a inflamação e lesão tecidual. A resposta Th2 desenvolve-se no contexto das alergias e das infecções helmínticas. Sua ativação resulta, em última instância, na inibição da resposta inflamatória aguda e desenvolvimento de quadros inflamatórios crônicos, sugerindo que sua importância fisiológica reside na regulação da resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007; LAMBERTUCCI *et al.*, 2001b).

Na esquistossomose, o linfócito Th2 controla a formação e manutenção do granuloma, o desenvolvimento de anticorpos contra os antígenos do ovo e a modulação do processo inflamatório, permitindo o desenvolvimento da fase crônica da infecção. A célula dendrítica, apresentadora de antígenos, atua na mediação da resposta Th2, ativando o linfócito CD4+. Ao atingir a fase crônica, a perpetuação da lesão induz a reparação tecidual através do desenvolvimento de fibrose, mediada pela resposta Th2. Os mecanismos que iniciam, amplificam e sustentam a polarização da resposta inflamatória permanecem sob investigação (PEARCE *et al.*, 2004; WYNN *et al.*, 2004).

As interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13) caracterizam o desenvolvimento de uma resposta do tipo 2. A IL-4 é produzida por mastócitos e pelas próprias células Th2. Ela estimula a diferenciação de células CD4+ imaturas em linfócitos Th2 e funciona como um fator de crescimento autócrino para as células Th2 já diferenciadas. Atua também na conversão de linfócitos B para a produção de imunoglobulinas de classe E (IgE). Em conjunto com a IL-13, contribui ainda para a ativação alternativa dos macrófagos, induzindo a produção de colágeno. A IL-5 também é produzida por mastócitos ativados e células Th2. Esta citocina estimula o crescimento e diferenciação de eosinófilos, além de ativar os eosinófilos já maduros. A IL-13 é produzida por células Th2, células T CD8+, e também por células *natural killers* (NK). Estimula os fibroblastos e macrófagos a produzirem colágeno através da indução da expressão do fator de transformação do crescimento (TGF- β). Estimula também a produção de IgE por linfócitos B. Finalmente, a IL-13 promove a inflamação através da indução da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas capazes de atrair granulócitos e monócitos, atuantes nas infecções parasitárias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Os macrófagos podem ser ativados por citocinas da resposta tipo 1, em um processo hoje denominado de ativação clássica. Já a ativação alternativa dos macrófagos pela IL-13, observada nos granulomas esquistossomóticos, é um mecanismo indutor da fibrogênese. Macrófagos ativados por esta via produzem arginase (Arg-1), que induz a produção de prolina, maiores granulomas e fibrose (WYNN *et al.*, 2004).

A IL-10, produzida por macrófagos ativados e células T reguladoras, tem ação moduladora da resposta imune. Inibe a produção de IL-12 por macrófagos ativados e células dendríticas, e a secreção de INF- γ , ambos indutores da resposta Th1 contra micróbios intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Há indícios de que a IL-10 esteja envolvida na conversão da resposta Th1 inicial no granuloma esquistossomótico para resposta Th2 (WYNN *et al.*, 2004).

Outros mecanismos relacionados à modulação da resposta imune e sobrevivência do hospedeiro com a forma crônica da doença têm sido investigados. Linfócitos B produtores da proteína de ligação Fas, linfócitos CD8+, e o receptor solúvel $\alpha 2$ da IL-13 (IL-13R $\alpha 2$) induzem a apoptose da célula Th2. Esse receptor tem atividade inibidora da ação da IL-13 na fibrogênese (WYNN *et al.*, 2004).

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular com diversas funções na mediação da resposta inflamatória. Todas as quimiocinas atuam sobre receptores transmembrana acoplados a proteína G, e cada receptor pode ser ativado por diferentes quimiocinas, o que resulta em algum grau de sobreposição e redundância de efeitos. Até o presente, mais de 50 quimiocinas e 19 receptores foram descritos. Dados experimentais em esquistossomose murina sugerem que as quimiocinas determinam o tipo e intensidade da reação inflamatória granulomatosa contra os antígenos do ovo. A CCL3, primariamente uma quimiocina relacionada com a migração de linfócitos Th1 e considerada característica da resposta tipo 1, tem destaque na produção da reação inflamatória granulomatosa esquistossomótica. Neste contexto, sua principal fonte é o macrófago, o que determina uma orientação da resposta inflamatória para o tipo 2. A CCL3 atua na formação do granuloma, na ativação do eosinófilo e na estimulação da fibrose pela indução da produção de hidroxiprolina. Os indivíduos que apresentam maiores concentrações plasmáticas de CCL3 têm risco aumentado de apresentar a forma hepatoesplênica. Um modelo, baseado no equilíbrio entre a ativação dos receptores CCR1 ou CCR5 pela própria CCL3 ou outro ligante, foi proposto com o objetivo de elucidar os mecanismos relacionados à evolução das diferentes formas clínicas da esquistossomose. De acordo com os autores, o receptor CCR5 teria um papel imunomodulador na esquistossomose, prevenindo o surgimento das formas crônicas graves (SOUSA-PEREIRA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006).

A disfunção mitocondrial é o evento central da fisiopatologia de diversas doenças caracterizadas pela lesão hepato-celular. A redução da atividade dos complexos protéicos da cadeia respiratória em doenças neoplásicas, no consumo de altas doses de álcool ou na redução do fluxo sanguíneo hepático, a produção de adipocitocinas pelo tecido gorduroso visceral nas esteato-hepatites, ou ainda o estado de permanente atividade inflamatória das hepatites crônicas e da translocação bacteriana no alcoolismo, favorecem a formação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), além da depleção de trifosfato de adenosina (ATP). A célula de Kupffer, ativada pelo estado inflamatório permanente, produz lesão oxidativa adicional e também o TNF- α , citocina central na amplificação da resposta inflamatória e nos mecanismos de morte celular (SATO, 2007). Os hepatócitos podem ser destruídos por dois mecanismos: apoptose ou necrose celular. O equilíbrio entre a ação da glutatona, moduladora do estado de oxi-redução celular e mitocondrial, e a

indução da produção de *ROS* na mitocôndria pelo $\text{TNF-}\alpha$, determina o mecanismo da destruição dos hepatócitos (GARCIA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2007). A mitocôndria atua no processo de morte celular através da abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial transitória. A abertura gradual permite a saída de proteínas ativadoras de fatores indutores de apoptose. Fatores que resultam na abertura maciça ou na exaustão rápida do ATP induzem à necrose celular, mesmo depois de desencadeado o processo de apoptose.

A remoção das células apoptóticas caracteriza-se pela fagocitose sem indução de resposta inflamatória. Já o direcionamento dos debrís resultantes desse processo apresenta implicações para a função imunológica. Se o processo ocorre de forma maciça ou se é sobreposto pela necrose celular, ocorre o extravasamento de conteúdo intracelular que desencadeia uma resposta inflamatória. Além disso, alguns dos indutores do processo de apoptose ou seus intermediários são também indutores ou moduladores da resposta inflamatória, como o $\text{TNF-}\alpha$ e o $\text{TGF-}\beta 1$ (BENEDETTI; MARUCCI, 1999).

A lesão hepática pela atividade oxidativa também foi demonstrada na esquistossomose (EL-SOKKARY *et al.*, 2002; HANNA *et al.*, 2005). Os macrófagos e eosinófilos contribuem para a produção de *ROS* desde as fases precoces da formação do granuloma (CHENSUE *et al.*, 1983). No entanto, a capacidade antioxidante do fígado na esquistossomose é reduzida, resultando na peroxidação de lipídeos, que se traduz em disfunção da membrana celular (FACUNDO *et al.*, 2004).

2.4 Fibrogênese

A célula estrelada, anteriormente denominada célula de Ito, célula armazenadora de gordura ou lipócito, representa cerca de um terço da população de células não parenquimatosas e aproximadamente 15% do total de células residentes no fígado, incluindo os hepatócitos. É uma população celular heterogênea, com fenótipos variados em termos de citofilamentos, conteúdo de retinóides e capacidade de ativação. Localiza-se preferencialmente nas proximidades dos sinusóides e seu citoesqueleto assume orientação circunferencial, justaposto ao endotélio. Em sua forma inativa, é a célula responsável pelo armazenamento e metabolismo dos retinóides. A partir de sua ativação, assume diferentes funções. Pode apresentar antígenos, produzir citocinas fibrogênicas e auxiliar na ativação da reação inflamatória e da regeneração celular através da produção de fatores de crescimento ou da sua própria diferenciação. Atua também no controle do tônus sinusoidal, da migração celular, da eritropoiese e da angiogênese. Depois de ativada,

participa principalmente da produção dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo (FRIEDMAN, 1993; GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007a).

Alterações fenotípicas são características do processo de ativação da célula estrelada. Ocorre inicialmente a proliferação celular e sua transição fenotípica para miofibroblastos. Característica desta fase é a expressão de α -actina e de filamentos finos proeminentes, conferindo à célula estrelada sua nova conformação de célula muscular lisa, com capacidade contrátil, responsiva aos fatores reguladores do tônus muscular endotelina-1 (ET-1), vasopressina e angiotensina-II. Começa então a produzir e secretar componentes da matriz extracelular e enzimas de degradação da matriz pré-existente. Através de sinalização química induz a atração de mais células estreladas e leucócitos. Finalmente, perde seu conteúdo de retinóides. O meio extracelular é modificado pela degradação e substituição dos componentes da matriz. Os novos componentes são, por sua vez, capazes de promover ativação celular adicional (FRIEDMAN, 1993; 1999; 2000; GRESSNER; BACHEM, 1990; GRESSNER, 1998; KISSELEVA; BRENNER, 2007).

O processo de ativação celular é comum aos diversos mecanismos iniciadores, sejam eles inflamação, necrose ou peroxidação. Os mediadores da ativação originam-se primariamente nas células de Kupffer, hepatócitos, linfócitos e plaquetas. Os eventos mais precoces derivam da expressão de genes reguladores do acúmulo da matriz extracelular ativados pelos fatores tipo Kruppel. Ocorre o aumento da expressão de receptores celulares para citocinas proliferativas e fibrogênicas, especialmente as tirosina-quinases (FRIEDMAN, 2000). O principal ativador da proliferação celular, o fator de crescimento derivado das plaquetas, PDGF, é produzido pelas plaquetas, células de Kupffer, endotélio e pelas próprias células estreladas ativadas. Outros indutores da proliferação da célula estrelada são os fatores de crescimento de fibroblastos e epidérmico (FGF, EGF), a IL-1, o TGF- α . O mais potente indutor de fibrogênese, o TGF- β 1, é produzido por diversos tipos celulares, inclusive por células estreladas já ativadas, de forma autócrina (BLAZEJEWSKY *et al.*, 1995; FRIEDMAN, 1993; 1999; NAKATSUKASA *et al.*, 1990). A inibição da síntese de TGF- β 1 em modelo experimental impede a produção da fibrose (QI *et al.*, 1999).

A célula ativada inicia a degradação da matriz pela liberação de enzimas metaloproteinases (MMP), e ao mesmo tempo modula este processo com a produção dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP). Dá-se a lise protéica dos componentes frouxos da matriz, entre eles o colágeno tipo IV (C-IV), e sua substituição por moléculas formadoras de fibrilas, os colágenos

tipo I e III (FRIEDMAN, 1993; KISSELEVA; BRENNER, 2007; NAKATSUKASA *et al.*, 1990). Entre os componentes não-colagenosos, verifica-se aumento do conteúdo de proteoglicanos, ácido hialurônico, laminina e fibronectina (GRESSNER; BACHEM, 1990). Já em 1973, foi demonstrado, em um estudo de necropsias, que o conteúdo de colágeno e de glicosaminoglicanos em fígados de pacientes portadores de hepatite alcoólica ou cirrose é maior que em pacientes com fígado normal ou com esteatose (GALAMBOS; SHAPIRA, 1973).

Três fases são identificadas no processo de ativação e diferenciação da célula estrelada – pré-inflamatória, inflamatória e pós-inflamatória. Na fase pré-inflamatória, os hepatócitos necróticos ou apoptóticos ativam diretamente as células estreladas. Este processo é mediado por fatores mitogênicos, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1 e o TGF- β . Em paralelo, observa-se a liberação de marcadores de lesão hepatocelular, LDH e AST. Na fase inflamatória, as células estreladas sofrem estímulo adicional pelos macrófagos residentes, leucócitos e plaquetas adventícias, células endoteliais sinusoidais e hepatócitos, para sua diferenciação em miofibroblastos. Os principais mediadores são o TGF- β e o TGF- α . A fase pós-inflamatória consiste na ativação de células estreladas ainda quiescentes e na perpetuação do estímulo de forma autócrina, pelas citocinas produzidas pelos próprios miofibroblastos (GRESSNER, 1998; GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER 2007a).

Recentemente, o papel exclusivo da célula estrelada na fibrogênese tem sido reavaliado. Fibroblastos portais e subcapsulares haviam sido identificados entre as células participantes da fibrogênese (BLAZEJEWSKI *et al.*, 1995; GEREMIAS *et al.*, 2004). Sabe-se hoje que o recrutamento, ativação e maturação de células derivadas da medula óssea e de monócitos do sangue periférico contribuem para o aumento da população de fibrócitos no tecido em sofrimento. Estes fenômenos são comandados por fatores de crescimento, como o fator estimulador de formação de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), por citocinas como o peptídeo quimiotático de monócitos (MCP-1), e por moléculas de adesão celular, ICAM-1, VCAM-1 e NCAM, produzidos pelas próprias células estreladas ativadas. Outro mecanismo, descrito recentemente, capaz de aumentar a população local de fibroblastos é a diferenciação das células do tecido em questão, de origem epitelial, em células do tipo mesenquimal, ou diferenciação epitélio-mesenquimal. Esse processo, bem caracterizado no contexto da embriogênese, tem sido identificado em organismos adultos em processos fibrogênicos nos rins, pulmões e também em modelos de fibrose hepática. A diferenciação de hepatócitos e colangiócitos foi identificada *in vitro*. Seus mediadores são o TGF- β , EGF, IGF-1 e FGF-2 (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007b).

O processo de fibrose foi, por longo tempo, considerado irreversível. O conceito atual, ao contrário, é de que o conteúdo da MEC resulta do equilíbrio entre a deposição e a degradação dos seus componentes (GRIMAUD *et al.*, 1987). Estudos têm sido direcionados para a compreensão dos mecanismos indutores e reguladores da degradação e reabsorção dos componentes da matriz, ou seja, da reversibilidade do processo de fibrose (ABDEL-AZIZ *et al.*, 1990; ANDRADE; GRIMAUD, 1988; ANDRADE *et al.*, 1992; ANDRADE; PEIXOTO, 1992; CAVALCANTI; BARBOSA Jr; ANDRADE, 2002; NAKAMUTA *et al.*, 2005).

O conhecimento da fisiopatologia da fibrogênese hepática, aliado ao desenvolvimento de técnicas laboratoriais para a dosagem de substâncias envolvidas na deposição, remodelação e degradação da matriz, possibilitou a identificação de marcadores úteis na investigação do grau de fibrose hepática. Contudo, é possível que as dosagens realizadas em sangue periférico não reflitam a real atividade do parênquima hepático. Torre *et al.* (2008) abordam essa questão, comparando amostras pareadas e simultâneas de sangue colhido na veia hepática direita na ocasião da realização de estudo hemodinâmico do sistema porta e de sangue periférico em 15 pacientes. O estudo mostrou boa correlação entre as dosagens hepática e periférica de diversos marcadores, entre eles o AH.

Alguns dos marcadores de fibrose resultam ou participam diretamente do processo de remodelamento, como o AH, o C-IV, MMPs, TIMPs, pró-colágeno tipo III, laminina, TGF- β e YKL-40 (AFDHAL; NUNES, 2004; GRIGORESCU, 2006). Nesta revisão são abordados o AH e o C-IV.

2.5 Ácido hialurônico

O aumento da produção de AH e outros componentes da MEC em modelo experimental de fibrose hepática foi demonstrado em 1977 (GRESSNER; PAZEN; GREILING, 1977). Este aumento foi atribuído a dois mecanismos paralelos. O primeiro seria a intensificação da síntese dos componentes da matriz pela célula estrelada, relacionada à exposição a fatores originados nas células de Kupffer ativadas (GALAMBOS *et al.*, 1977; GRESSNER; HAARMANN, 1988; GRESSNER, 1998; MEYER *et al.*, 1990). O segundo, a redução do clareamento do AH. Este clareamento acontece através de endocitose mediada por receptores e metabolização enzimática pela hialuronidase nos lisossomos das células endoteliais sinusoidais (FRASER, 1986; GUÉCHOT, 1995; SMEDSRØD, 1995; UENO *et al.*, 1993).

O AH é uma molécula do grupo dos glicosaminoglicanos, polissacarídeos de estrutura linear, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo frouxo. Os proteoglicanos, também do grupo dos glicosaminoglicanos, são produzidos dentro do complexo de Golgi pelo alongamento de sua porção não reduzida. Esses compostos ligam-se covalentemente a um núcleo peptídico e possuem grupos sulfatados. A molécula do AH, ao contrário, é alongada pelo acréscimo de dissacarídeos de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina em sua terminação reduzida, sem a participação de cadeias peptídicas ou radicais sulfatados. O processo ocorre na face interna da membrana plasmática celular e a seguir as moléculas são transferidas para o meio pericelular. Uma característica importante é seu elevado peso molecular, da ordem de 10^5 a 10^7 M (FRASER *et al.*, 1997; LAURENT; FRASER, 1992).

Cerca de metade do conteúdo corporal total de AH localiza-se na pele, a quarta parte nos ossos e articulações, e o restante divide-se entre os músculos e vísceras. Acredita-se que virtualmente todas as células dos organismos vertebrados sejam, em algum momento, capazes de produzi-lo. Em organismos completamente amadurecidos, quase exclusivamente as células de linhagem mesodérmica, além das células da epiderme, retêm esta propriedade. Estima-se que o conteúdo de AH de um adulto de 70 kg seja de 11 a 17g. A concentração do AH no soro varia com a idade, ocorrendo aumento com o passar dos anos. Também alteram sua concentração normal as doenças fibrosantes, colagenoses, septicemias, neoplasias e doença renal crônica (FRASER *et al.*, 1997; LAURENT; FRASER, 1992).

No meio extracelular, o AH encontra-se totalmente ionizado. Tem atividade oncótica elevada e essa característica lhe confere papel importante na distribuição e movimentação da água tecidual. Sua organização espacial em espiral determina a formação de regiões hidrofóbicas que interagem com a membrana celular e outras estruturas lipídicas. Deve-se também a esta estrutura em espiral uma relativa rigidez da molécula. O AH interage com fibras colágenas e outras macromoléculas de forma a determinar sua permeabilidade à água e outras moléculas menores. Formam-se regiões de exclusão, e moléculas como a albumina, partículas virais e anticorpos podem ser contidas espacialmente. Outras propriedades fundamentais do AH, úteis à formação estrutural dos tecidos, são sua alta viscosidade e elasticidade (FRASER *et al.*, 1997; LAURENT; FRASER, 1992).

O AH funciona como um estabilizador da MEC, lubrificante das articulações, regulador da homeostase hídrica e da distribuição protéica plasmática, protetor contra a disseminação de microorganismos e regulador das atividades celulares (GERDIN; HÄLLGREN, 1997; FRASER *et al.*, 1997). Atua como citocina pró-inflamatória através de sua interação com o receptor CD44. A

afinidade do AH pelo CD44, proteína de superfície amplamente distribuída pelos tecidos, foi definida em experimentos com culturas de células (ARUFFO *et al.*, 1990). Os estímulos inflamatórios promovem um aumento da expressão de AH na superfície das células endoteliais. A ligação do AH com o CD44 de linfócitos e macrófagos induz a migração dessas células através dos vasos em direção aos sítios inflamatórios (MOHAMADZADEH *et al.*, 1998). Modelos experimentais de fibrose hepática demonstraram distribuição coincidente do CD44 e do AH no exame histológico do fígado (SATOH *et al.*, 2000) e sua participação na endocitose pela célula sinusoidal hepática, responsável pelo clareamento do AH (TAMAKI *et al.*, 1996).

A meia-vida do AH é de 2,5 a 5,5 min e sua taxa de renovação diária varia de 10 a 100 mg. Sua meia vida nos tecidos varia de 0,5 a 3 dias. A maior parte do AH é removida para a corrente sanguínea através da circulação linfática. As moléculas de peso molecular mais elevado são avidamente extraídas da circulação durante a passagem pelos linfonodos. A maior parte do restante é eliminado pela endocitose e catabolismo mediada pelo receptor CD44 no endotélio sinusoidal hepático. Uma pequena parte sofre eliminação renal e uma porção variável pode ser metabolizada pelo baço. Esses dados sugerem que o clareamento do AH pode depender significativamente da capacidade funcional das células endoteliais especializadas do fígado. A substituição do endotélio sinusoidal por endotélio capilar, como ocorre na cirrose, é capaz de impedir o clareamento do AH e de outras substâncias por este mecanismo (FRASER *et al.*, 1984, 1997; LAURENT; FRASER, 1992; UENO *et al.*, 1993).

Métodos de ensaio radiométrico com iodo 125 e radioimunoensaio foram inicialmente utilizados para a dosagem do ácido hialurônico. Mais tarde, foram substituídos pelo ensaio imunoenzimático, hoje disponível na forma de *kits* comerciais (MARTINS *et al.*, 2003; PLEBANI; BURLINA, 1991). A identificação da elevação do nível do AH em pacientes com hepatopatia fibrosante de diversas etiologias deu início a numerosas investigações de sua utilidade no diagnóstico da atividade inflamatória hepática, fibrose e cirrose (ENGSTRÖM-LAURENT *et al.*, 1985; FRÉBOURG, 1986). A utilidade diagnóstica da dosagem do AH foi comparada com achados anátomo-patológicos, com marcadores séricos de atividade inflamatória e de necrose hepática, e com outros marcadores bioquímicos de fibrose hepática na cirrose biliar primária, nas hepatites virais crônicas e na doença hepática alcoólica, inclusive a cirrose (FURUSYO *et al.*, 2000; GUÉCHOT *et al.*, 1994, 1996; LEROY *et al.*, 2004; McHUTCHISON *et al.*, 2000; MURAWAKI *et al.*, 1996b; NYBERG *et al.*, 1988, 1992; OBERTI *et al.*, 1997; PARÉS *et al.*, 1996; STICKEL *et al.*, 2001, 2003; TANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 1998). Em sequência, foi utilizado experimentalmente como marcador prognóstico e das alterações na fibrose hepática

determinadas pelo tratamento da hepatite viral crônica com INF (GALLORINI *et al.*, 1994; GUÉCHOT *et al.*, 1995, 2000; ISHIBASHI *et al.*, 1996; LEBENSZTEJN *et al.*, 2006; LEROY *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 1996).

Recentemente, o ácido hialurônico tem sido utilizado na monitorização do tratamento da fibrose hepática com inibidores da enzima conversora de angiotensinogênio em modelos experimentais e em pacientes portadores de cirrose. Os pacientes tratados exibiram redução dos níveis séricos de ácido hialurônico e da pressão venosa do sistema porta (DEBERNARDI-VENON *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2000).

2.6 Colágeno IV

O conteúdo de colágeno do fígado humano normal corresponde a aproximadamente 2% de seu peso seco e pode elevar-se a cerca de 10% em doenças fibrosantes. Este conteúdo compreende uma mistura heterogênea de colágenos. Os tipos I e III representam cerca de 80% do colágeno hepático total e são os principais componentes do colágeno intersticial. O colágeno tipo IV é o principal componente colagenoso da membrana basal de vasos sanguíneos e ductos biliares. No espaço de Disse, forma depósitos lineares em condições produtoras de fibrose. Representa cerca de 7% do colágeno hepático total em fígados normais e é produzido preferencialmente pelas células estreladas em repouso (AYCOCK; SEYER, 1989; KNITTEL *et al.*, 1992).

A molécula do C-IV é constituída por duas porções colagenosas em hélice tripla, a porção central e a porção aminoterminal, chamada de 7S, e uma terminação carboxílica globular não colagenosa, chamada de NC. Um modelo de organização das moléculas em rede foi proposto em 1981 por Timpl *et al.* As extremidades aminoterminais de quatro moléculas ligam-se formando o domínio 7S e no outro pólo de cada molécula, a terminação globular não colagenosa se une à de outra molécula, formando o domínio NC-1. Acredita-se que esta organização espacial seja apropriada à membrana basal por conferir-lhe flexibilidade para a adaptação às rápidas modificações de sua área, de acordo, por exemplo, com o tónus dos vasos sanguíneos (TIMPL *et al.*, 1981).

Estados inflamatórios, doenças fibrosantes de qualquer etiologia e o crescimento tumoral provocam destruição ou desequilíbrio da arquitetura da membrana basal (SCHUPPAN *et al.*, 1986). A localização e tipificação das fibras colágenas em fígados humanos através de técnicas imuno-histológicas contribuiu para a elucidação de sua arquitetura e distribuição espacial em relação com as células hepáticas. O C-IV foi encontrado na composição do tecido frouxo

intersticial, na camada de tecido conjuntivo no entorno de vasos e ductos biliares nos tratos portais e ao longo dos sinusóides, entre as células endoteliais e os hepatócitos na intimidade do parênquima, sem, contudo, formar uma camada laminar contínua, mas assumindo um padrão pontilhado. Em condições patológicas fibrosantes, intensifica-se sua deposição tanto no espaço de Disse, entre os hepatócitos e as células endoteliais sinusoidais, como nos tratos portais e ao longo dos septos fibrosos na cirrose (GRIMAUD *et al.*, 1980, HAHN *et al.*, 1980; PLEBANI; BURLINA, 1991).

Métodos imunológicos de dosagem do C-IV foram desenvolvidos com anticorpos capazes de detectar as diferentes regiões da molécula. A dosagem através de radioimunoensaio utilizando anticorpos policlonais foi aplicada às regiões 7S e NC-1 (GARBISA *et al.*, 1980; NIEMELÄ *et al.*, 1985; RISTELI; RHODE; TIMPL, 1981; SAVOLAINEN *et al.*, 1988). Sugere-se que os níveis do 7S no soro representem a atividade de síntese no tecido (SUOU *et al.*, 1996). Um ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais foi desenvolvido para a detecção da tripla hélice central (OBATA *et al.*, 1989). Ficou demonstrada a utilidade dessas técnicas na dosagem do C-IV em soro e amostras de tecidos (RISTELI; RHODE; TIMPL, 1981), bem como sua boa correlação com a biópsia na detecção de fibrose hepática (MURAWAKI *et al.*, 1994, 1995, 1996a).

Estudos em culturas de células com técnicas de separação apurada, e estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* em hepatócitos de camundongos e humanos, definiram que a produção de fibras colágenas ocorre nos miofibroblastos, células epiteliais de ductos biliares e células endoteliais (FRIEDMAN *et al.*, 1985; HERBST *et al.*, 1997; LEEUW *et al.*, 1984; MAHER; MCGUIRE, 1990; SAVOLAINEN *et al.*, 1984).

Os maiores conteúdos de C-IV foram encontrados em portadores de doença hepática alcoólica em comparação com as doenças não alcoólicas, e ambos em comparação com os controles. Entre os portadores de hepatite viral, os maiores valores ocorrem na hepatite aguda, seguindo-se aumento gradual na doença crônica de acordo com a progressão da fibrose (TSUTSUMI *et al.*, 1993).

O C-IV foi utilizado na avaliação dos efeitos do tratamento da hepatite C crônica com interferon sobre a fibrose hepática (HIRAMATSU *et al.*, 1995; MATSUZAKI *et al.*, 1993; YABU *et al.*, 1994). Diferenças significativas foram encontradas entre os níveis de C-IV em pacientes dialíticos portadores de hepatite C crônica e controles sem VHC, em um estudo prospectivo de 10 anos no Japão (FURUSYO *et al.*, 2000). Demonstrou-se também boa acurácia diagnóstica através da curva

ROC na avaliação da fibrose hepática em portadores de doença crônica por vírus B (MURAWAKI *et al.*, 2001) e em crianças portadoras de fibrose cística (PEREIRA *et al.*, 2004).

A realização da dosagem do C-IV em associação à dosagem da laminina conferiu maior valor preditivo positivo para o diagnóstico de fibrose hepática associada a esteatose não alcoólica (SANTOS *et al.*, 2005).

Níveis peroperatórios elevados de C-IV foram preditivos de falência hepática pós-operatória em portadores de injúria hepática crônica após se submeterem a ressecção hepática em diversos níveis (SHIMAHARA *et al.*, 2002). Também no tratamento cirúrgico do carcinoma hepatocelular relacionado às hepatites virais, o C-IV foi considerado bom marcador do risco de falência hepática e de recorrência pós-operatória (KUBO *et al.*, 2003; 2004). Estes achados apontam o colágeno IV como um parâmetro associado à atividade das células produtoras da matriz extracelular induzidos pela injúria hepática aguda ou crônica.

2.7 Marcadores de fibrose e esquistossomose

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

Indicadores de morbidade de fácil execução e baixo custo são exaustivamente investigados para o diagnóstico na esquistossomose mansônica. Os marcadores bioquímicos da fibrose hepática foram avaliados na esquistossomose pela primeira vez em 1988, em comparação com o exame clínico. Um estudo foi realizado no nordeste do Brasil, incluindo 102 indivíduos portadores de esquistossomose e 35 controles pareados por sexo e idade. Vinte dos pacientes apresentavam as formas hepática ou hepatoesplênica, identificadas pelo aumento do fígado ou do fígado e do baço à palpação abdominal, e 82 eram comprovadamente infectados com *S. mansoni*, mas não tinham indícios clínicos de acometimento hepático. O estudo teve o objetivo de identificar parâmetros

bioquímicos capazes de discriminar os portadores das formas intestinais da esquistossomose daqueles com doença hepática e alterações da hemodinâmica portal. Entre outros marcadores, realizou-se a dosagem do peptídeo pro-colágeno tipo III (PIIP), como marcador da síntese do colágeno. Os autores identificaram níveis de PIIP significativamente maiores nos pacientes com fígado palpável que nos portadores da forma intestinal e nos controles ($p < 0,001$) (ZWINGENBERGER *et al.*, 1988a).

Em outro estudo, o nível do PIIP no soro foi avaliado em 22 pacientes portadores de hepatomegalia de etiologia esquistossomótica no Zaire, antes e após o tratamento com praziquantel. Portadores de esquistossomose intestinal e controles não infectados, pareados por sexo e idade, também foram incluídos. Foi demonstrada elevação dos níveis PIIP após o tratamento nos portadores da forma hepatoesplênica, e não nos intestinais ($p < 0,001$). Esta elevação foi considerada sugestiva de liberação do peptídeo em consequência da degradação do tecido fibrótico após a resolução da infecção (ZWINGENBERGER *et al.*, 1988b).

Outro estudo avaliou o efeito do tratamento com praziquantel sobre os metabólitos do tecido conjuntivo. Crianças e adolescentes residentes de uma área rural no Egito, portadores da forma intestinal da esquistossomose mansônica, foram avaliados em comparação com controles pareados procedentes de uma área urbana. O AH e o PIIP foram dosados antes e após o tratamento com praziquantel, utilizando o radioimunoensaio. Os autores encontraram níveis mais elevados de AH em indivíduos infectados, em comparação com seus controles pareados ($p < 0,05$ para crianças e $p < 0,001$ para adolescentes). Os níveis foram reavaliados 4 e 8 semanas após o tratamento. Houve redução significativa tanto entre as crianças ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) quanto entre os adolescentes ($p < 0,001$ nas duas ocasiões). Ocorreu elevação dos níveis de PIIP em relação aos níveis pré-tratamento em crianças, 4 e 8 semanas após o tratamento ($p < 0,05$ e $p < 0,001$). A elevação dos níveis de AH nos indivíduos infectados foi atribuída à maior produção do marcador em consequência do processo inflamatório granulomatoso (HASSANEIN *et al.*, 1997).

Burchard *et al.* (1998) avaliaram marcadores bioquímicos de fibrose, entre eles o AH, em comparação com o US. O estudo foi realizado em uma área no Senegal, onde a transmissão da infecção esquistossomótica havia sido recém introduzida devido a alterações do ecossistema induzidas pelo homem. Um total de 470 pacientes foram incluídos, sendo 240 adultos. Os marcadores foram dosados pelo método de ensaio radiométrico, apenas em adultos, escolhidos randomicamente em cada grupo. A prevalência da infecção esquistossomótica encontrada pelo exame de fezes foi de 81,5%. O diagnóstico da fibrose pelo ultra-som foi dado por dois

examinadores, de acordo com dois protocolos distintos (CAIRO WORKING GROUP, 1992; RICHTER *et al.*, 1992a). Houve concordância inequívoca entre os dois protocolos apenas para 12 pacientes portadores de fibrose considerada avançada por ambos os examinadores. Os níveis de AH estavam elevados em 26,8% dos casos. Porém, não houve correlação entre a elevação do marcador e a fibrose ao US, tanto na comparação com os critérios de fibrose como em comparação com a organometria. Dois fatores foram apontados para justificar a ausência de correlação do AH com o US. Em primeiro lugar, as classificações ultra-sonográficas de fibrose foram consideradas arbitrárias e possivelmente imprecisas para o diagnóstico da fibrose recente. Segundo, os autores sugeriram que a elevação do AH, bem descrita para outras patologias hepáticas, esteja mais correlacionada com as alterações da função hepática e com a hipertensão portal do que com a fibrose em si. Para a análise desse estudo, no entanto, é preciso levar em conta que a introdução da doença na região em questão deu-se de forma epidêmica, menos de uma década antes da realização do estudo. Dessa forma, é possível que as formas com fibrose hepática definida ainda não existissem na população local.

Ricard-Blum *et al.* (1999) avaliaram prospectivamente diversos marcadores de fibrose em comparação com o escore ultra-sonográfico então preconizado pela OMS (CAIRO WORKING GROUP, 1992). O estudo foi realizado em um foco hiperendêmico de esquistossomose em Madagascar, antes e seis, 12 e 24 meses após o tratamento com praziquantel. A prevalência de infecção descrita foi de 62%, e 69% dos pacientes apresentavam esplenomegalia. Os autores não informaram a idade dos pacientes incluídos nem a ocorrência de doenças coendêmicas. O AH foi dosado, pelo método de ensaio radiométrico, em 156 pacientes, entre os quais 56 não tiveram imagem de fibrose ao ultra-som, 63 tiveram fibrose leve (escore 1) e 37 fibrose intensa (escore 2 ou 3). A concentração do AH mostrou boa correlação com o escore de fibrose adotado ($r = 0,505$; $p = 0,003$). Um ano após o tratamento, os níveis de AH sofreram redução significativa em relação aos níveis pré-tratamento e a correlação com a gravidade da fibrose foi mantida. A alta frequência de esplenomegalia observada é inesperada para uma área endêmica somente para esquistossomose. É possível que outra patologia, como a malária, tenha contribuído para este achado de esplenomegalia, causando a falsa impressão de uma frequência muito elevada da forma hepatoesplênica.

Pascal *et al.* (2000) avaliaram marcadores de estresse oxidativo e de fibrose no soro em 35 pacientes adultos de uma área endêmica no Sudão, em comparação com a classificação ultra-sonográfica descrita por Doehringer-Schwerdtfeger *et al.* (1989). Trinta e cinco pacientes entre 18 e 50 anos foram incluídos. Os resultados foram comparados com dois grupos controles: um grupo

de sudaneses composto de 27 homens residentes na região endêmica, e um grupo de 24 pessoas residentes na Europa. Oito pacientes tiveram o grau de fibrose classificado como de grau II ou III, oito não apresentavam fibrose e 19 tinham fibrose leve (grau I) ao ultra-som. O AH foi dosado pelo método radiométrico. Seus níveis foram maiores que nos controles sudaneses e europeus ($p < 0,01$). Pacientes com fibrose leve e moderada ou grave apresentaram concentração média de AH de 66 e 110 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Essas concentrações correlacionaram-se com a gravidade da fibrose detectada à ultra-sonografia e com os níveis de peróxido de lipídeos, sugerindo uma associação entre a elevação do AH e os processos oxidativos em curso. Os autores descrevem as médias de concentrações dos grupos de fibrose hepática, sem identificar pontos de corte para o diagnóstico da sua presença e intensidade. Talvez por isso tenham relatado níveis tão elevados, comparáveis aos descritos para o diagnóstico de cirrose em comparação com esquistossomóticos (KÖPKE-AGUIAR *et al.*, 2002). É possível também que o método de dosagem utilizado por Pascal *et al.* (2000) apresente menor sensibilidade na detecção do marcador, resultando em concentrações médias mais elevadas.

Utilizando-se o método imuno-enzimático em sanduíche, Köpke-Aguiar *et al.* (2002) realizaram a dosagem do ácido hialurônico em 24 pacientes de ambulatório com infecção crônica pelo *S. mansoni*, confirmada pelo exame de fezes, em comparação com sete pacientes cirróticos. Os pacientes esquistossomóticos foram classificados em grupos definidos ecográfica e endoscopicamente. O grupo com a forma leve, caracterizada pela ausência de varizes esofagianas ou esplenomegalia, foi composto por 15 pacientes. Nove pacientes foram incluídos no grupo com a forma grave compensada, caracterizada pela presença de esplenomegalia e varizes esofagogástricas com ou sem gastropatia hipertensiva, mas sem ascite, icterícia ou encefalopatia. Os autores identificaram pacientes com a forma leve a partir de 20 $\mu\text{g/l}$ e níveis acima de 80 $\mu\text{g/l}$ diferenciaram os pacientes cirróticos dos pacientes com a forma grave da esquistossomose. A extrapolação dos dados desse estudo, no entanto, deve ser cautelosa, já que a amostra é composta por pacientes selecionados, atendidos em ambulatório de referência.

Marcadores sorológicos de fibrose e do estresse oxidativo foram considerados úteis na diferenciação da injúria hepática crônica resultante da esquistossomose e das hepatites virais no Sudão. Os marcadores foram dosados em 50 pacientes residentes em uma área endêmica e em 24 controles sudaneses de área não endêmica e 34 franceses. Entre os pacientes, 15 não tinham fibrose ao ultra-som, 21% tinham sorologia positiva para hepatite B e 4% para hepatite C. Enquanto os níveis de AH mostraram-se elevados e correlacionados com a fibrose ao ultra-som, o malondialdeído, marcador do estresse oxidativo, mostrou valores elevados apenas nos pacientes

portadores de hepatite viral ($p = 0,0001$ e $0,398$, respectivamente). Utilizando-se o ultra-som como padrão ouro para fibrose, o AH correlacionou-se com a presença e gravidade da fibrose, sem sobreposição com o malondialdeído, marcador da presença de infecção viral (EBOUMBOU *et al.*, 2005).

Existem dados contraditórios a respeito da deposição do C-IV na patologia hepática esquistossomótica. Um aumento de sua expressão e deposição na membrana basal dos vasos sanguíneos e canais biliares nas fases crônicas da esquistossomose mansônica experimental foi identificado através da imunofluorescência. Esse aumento foi atribuído à vascularização progressiva das lesões hepáticas com a evolução da doença (ANDRADE; GRIMAUD, 1986; GRIMAUD *et al.*, 1987; PARISE *et al.*, 1985; SINGH *et al.*, 2004). Outros autores identificaram, também em modelos experimentais de esquistossomose, a deposição do C-IV no interior e no entorno dos granulomas em fases mais precoces da infecção (JACOBS *et al.*, 1997, 1998).

Um estudo em modelo experimental de esquistossomose mansônica foi realizado com o objetivo de analisar o efeito do tratamento com praziquantel sobre a distribuição dos colágenos intersticiais tipo I e III, e dos colágenos tipo IV e V, componentes da membrana basal. Doses terapêuticas foram administradas a dois grupos de camundongos, um após sete e outro após 12 semanas de infecção. Os animais foram sacrificados após 14 ou 20 semanas da infecção e amostras do fígado foram examinadas por imunofluorescência. O estudo mostrou que o tratamento iniciado no momento mais precoce da infecção permitiu a regressão quase completa da fibrose, evidenciada pela redução da quantidade de colágenos tipo I, IV e V e ausência quase total do tipo III na última análise (EL-BADRAWY *et al.*, 1991).

Em uma área endêmica para esquistossomose japônica na China (LI *et al.*, 2000), comparou-se a dosagem de C-IV e AH dois anos após o tratamento em massa com praziquantel, com o diagnóstico de fibrose dado pelo ultra-som, seguindo o protocolo do Cairo (CAIRO WORKING GROUP, 1992). Uma amostra de 193 pacientes constituiu uma coorte em que os indivíduos infectados atingiram a cura parasitológica após um ou mais cursos de tratamento. A prevalência pré-tratamento da esquistossomose era de 28%. Dois anos após o tratamento, 22% dos pacientes haviam sofrido reinfeção. Ainda assim, observou-se melhora dos sinais ecográficos de morbidade – redução do grau de fibrose do parênquima hepático, do tamanho do lobo esquerdo do fígado e do baço e do diâmetro da veia porta, indicando impacto positivo do tratamento sobre a morbidade. É interessante notar a persistência das alterações ecográficas entre os pacientes que relatavam abuso do álcool. Os níveis do AH e C-IV, dosados pelo método *ELISA*, eram elevados

em 31,9 e 25,5% dos pacientes, respectivamente. O AH mostrou correlação significativa com a fibrose ($p < 0,001$). Os níveis do C-IV associaram-se com a presença de reinfeção e sua intensidade ($p < 0,05$). Esses dados estão de acordo com os achados histológicos de Jacobs *et al.* (1997; 1998), sugerindo maior relação do C-IV com a inflamação ativa.

O C-IV foi avaliado pela primeira vez na esquistossomose mansoni humana por Shahin *et al.* (1992) no Egito através da dosagem do seu pró-peptídeo C (PCP), considerado marcador da degradação do colágeno. Foram também analisados o PIIIIP, o peptídeo pró-colágeno tipo I e o colágeno tipo VI. Ao todo, 100 pessoas foram incluídas: 15 adultos egípcios saudáveis, 69 pacientes com história de infecção por *S. mansoni*, associado ou não a infecção por *S. hematobium*, e 16 alemães portadores de cirrose alcoólica diagnosticada pela histologia. Entre os portadores de esquistossomose, 28 tinham infecção ativa sem lesão orgânica, 27 eram portadores da forma hepatoesplênica e 14 apresentavam complicações da hipertensão portal. Trinta pacientes foram submetidos a biópsia hepática para avaliação imuno-histoquímica (18 hepatoesplênicos e 12 com complicações). Não há descrição do tipo de biópsia realizada. O PCP foi determinado por radioimunoensaio e apresentou níveis crescentes, de acordo com a gravidade da fibrose hepática. Os autores consideram esse achado compatível com o alto catabolismo do colágeno que acompanha a intensa atividade de síntese nas fases avançadas da doença. A análise imuno-histoquímica mostrou aumento de todos os tipos de colágeno avaliados, mas em nenhum caso houve correlação com o grau de fibrose, podendo refletir o caráter dinâmico dos marcadores do metabolismo do colágeno em comparação com o exame histológico. A maior deposição do colágeno IV foi observada nas regiões de proliferação vascular e ductal e ocasionalmente no espaço perisinusoidal, denotando capilarização incipiente dos sinusóides.

Em estudo em área endêmica para esquistossomose mansônica na Tanzânia, os autores investigaram os marcadores de colágeno, em comparação com imagens sugestivas de fibrose periportal, hipertensão portal e visceromegalias ao ultra-som (KARDORFF *et al.*, 1999). Foram avaliados o PIIIIP, o PCP e a laminina. Duzentos e seis pacientes foram examinados. Apenas os níveis do PCP tiveram correlação significativa com a fibrose periportal ao US ($p < 0,001$), com a esplenomegalia ($p < 0,002$), com a dilatação de veia porta ($p < 0,004$) e com a presença de colaterais ($p < 0,001$). No entanto, o marcador apresentou baixa sensibilidade para a detecção da fibrose periportal avançada, o que, segundo os autores, limitaria sua utilização para o rastreamento das formas avançadas da doença em áreas endêmicas.

Na China, Guangjin *et al.* (2002) investigaram 38 pacientes portadores de esquistossomose japônica submetidos a esplenectomia para tratamento da hipertensão portal. Antes da cirurgia, todos foram submetidos à ultra-sonografia. A dosagem dos marcadores de fibrose, AH, PIII e C-IV, foi feita por radioimunoensaio. Durante a cirurgia foi realizada a biópsia hepática em cunha de todos os pacientes. O AH e o C-IV tiveram níveis mais elevados nos pacientes do que os valores de referência do teste. Contudo, em mais de 50% das amostras havia doença hepática viral associada, e não houve diferença entre os valores encontrados nos pacientes com esquistossomose e nos pacientes com hepatite associada.

O C-IV foi também investigado para a detecção e avaliação da progressão da fibrose hepática relacionada com a esquistossomose no Brasil (WYSZOMIRSKA *et al.*, 2005). Em 64 pacientes portadores de diferentes formas clínicas da esquistossomose, o C-IV teve maiores níveis séricos em comparação com 18 controles. Porém, não foi encontrada correlação com o espessamento periportal ao ultra-som. Posteriormente, os autores avaliaram o efeito da esplenectomia nos níveis do C-IV em 24 portadores da forma hepatoesplênica com indicação de cirurgia para tratamento da hipertensão portal. Houve redução significativa dos níveis de C-IV em relação aos níveis pré-operatórios dois e 60 dias após a intervenção ($p = 0,04$ e $p = 0,015$, respectivamente). Novamente, não foi encontrada correlação entre os níveis de C-IV e o grau de fibrose hepática avaliado pela ultra-sonografia e pela histologia. Os autores sugerem que o baço, sendo sítio de ativação de células inflamatórias capazes de produzir citocinas fibrogênicas, contribuiria para o desenvolvimento da fibrose hepática da esquistossomose (WYSZOMIRSKA *et al.*, 2006).

A patologia do baço na esquistossomose hepatoesplênica deve-se, principalmente, à expansão congestiva da polpa vermelha com espessamento progressivo dos cordões esplênicos. Dados foram obtidos da análise histológica, ultra estrutural, morfométrica e imuno-histoquímica do baço de 34 portadores de esquistossomose hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia para tratamento da hipertensão portal. O espessamento dos cordões nos órgãos examinados era secundário à deposição exclusiva de componentes da membrana basal, especialmente o C-IV e laminina. O acúmulo de componentes colagenosos intersticiais tipo I e III não foi encontrado senão em regiões focais da polpa vermelha. O estudo sugere que, em resposta à congestão passiva crônica, possa haver intensa deposição de componentes da membrana basal, com destaque para o C-IV, resultando no espessamento dos cordões (FREITAS *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a dosagem sérica de marcadores bioquímicos de fibrose, ácido hialurônico e colágeno IV, no diagnóstico da lesão hepática de pacientes com esquistossomose mansônica em área de alta prevalência no Estado da Bahia.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Avaliar a presença e a intensidade da fibrose hepática esquistossomótica através da ultra-sonografia abdominal dos pacientes residentes em área endêmica de esquistossomose.
- 3.2.2 Dosar o ácido hialurônico e o colágeno IV no soro de pacientes de área endêmica estudados pela ultra-sonografia.
- 3.2.3 Verificar a existência de correlação entre os marcadores bioquímicos dosados e o diagnóstico ultra-sonográfico de fibrose hepática.
- 3.2.4 Identificar as variáveis associadas com as alterações dos marcadores.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Histórico

4.1.1 ÁREA DE ESTUDO. O município de Santa Maria da Vitória localiza-se na região sudoeste da Bahia e dista aproximadamente 580 km de Brasília (FIG. 1). Situa-se na formação do Planalto Central e é irrigada pelo rio Corrente e seus afluentes. O rio Corrente é um importante afluente da margem oeste do São Francisco. O córrego Água Quente, afluente do rio Corrente, nasce ao noroeste da sede do município de Santa Maria da Vitória e corre em sentido sul, banhando o vale do Brejo do Espírito Santo, distrito da área rural. O córrego segue um curso de 15 quilômetros e termina em uma grande lagoa. Às suas margens, situavam-se fazendas, que originaram dezessete povoados. Brejo do Espírito Santo, por ser o mais antigo e mais central deles, empresta seu nome à região. Os pacientes incluídos neste estudo procedem desses povoados (GUEVARA, 2005).

A água do córrego Água Quente é utilizada por toda a população da região para a irrigação, especialmente das lavouras de cana-de-açúcar. O córrego é perene, o que torna a terra mais valorizada e a população relativamente fixa (GUEVARA, 2005).

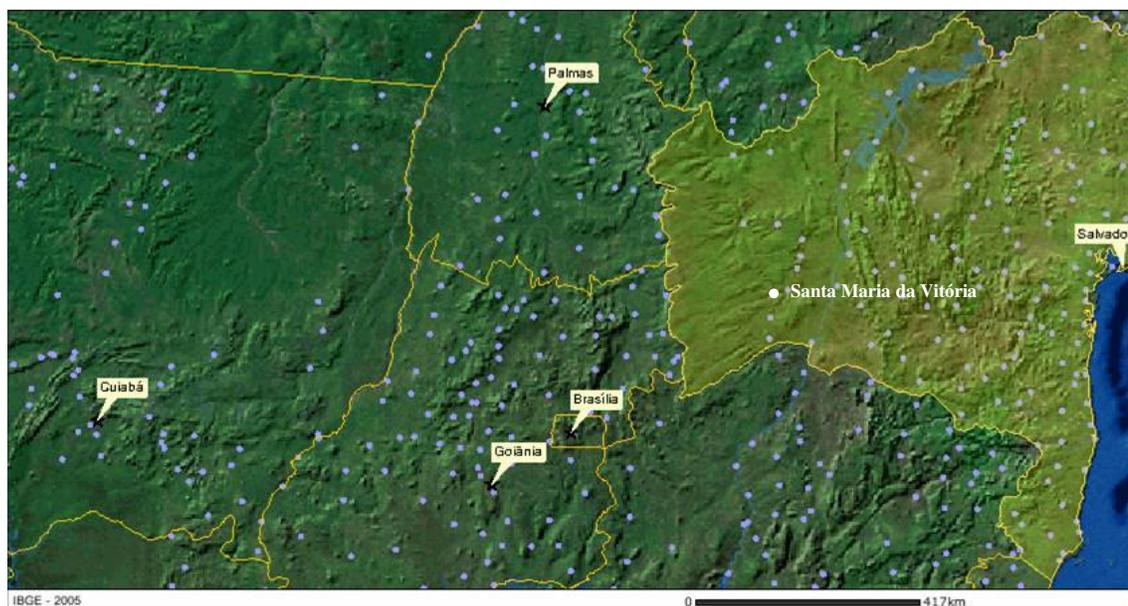


FIGURA 1 - Foto tirada por satélite da localização de Santa Maria da Vitória. Fonte: IBGE, 2005

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENDEMIA. O conhecimento sobre a esquistossomose na região baseia-se em estudo prospectivo de 29 anos, iniciado em 1976 (GUEVARA, 2005). O diagnóstico parasitológico e o exame clínico foram empregados em sete ocasiões até 2002, de maneira padronizada, para o acompanhamento dos indivíduos e a caracterização da endemia na região. Testes imunológicos em amostras da população foram realizados em 1976 e 2002. Em 2004 realizou-se a ultra-sonografia abdominal de uma amostra da população.

Diagnóstico parasitológico. A prevalência de esquistossomose encontrada na primeira avaliação global, em 1976, utilizando apenas um exame parasitológico das fezes, foi de 75,2%, e na última, realizada em 2002, foi de 1,8%. Em 2004 foi realizada uma investigação coproscópica por amostragem incluindo 382 indivíduos, com até quatro exames por indivíduo. Setenta e quatro (19,1%) exames foram positivos. (GUEVARA, 2005). Os exames coproscópicos foram realizados pelo método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) em todas as oportunidades e também pelo método de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919) em 2002 e 2004.

Diagnóstico imunológico. Inquéritos sorológicos foram realizados entre 2002 e 2004 pelos métodos de ensaio imunoenzimático com antígeno solúvel do ovo – ASO de *S. mansoni* (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000) e da prova de precipitação periovular – PPCO (SPENCER et al., 1991), em amostras da população. Os resultados dos testes sorológicos foram validados através da comparação com o exame das fezes e, em seguida, foram utilizados para um cálculo da prevalência estimada para a população. Este cálculo detectou uma prevalência de 16% (GUEVARA, 2005).

Diagnóstico clínico. A avaliação clínica realizada nas diversas ocasiões obedeceu sempre aos mesmos critérios, classificando os pacientes nas formas clínicas descritas abaixo (PRATA, informações pessoais):

- a) forma hepatointestinal, com fígado não palpável ou palpável e sem alterações significativas;
- b) forma hepatointestinal com lesões hepáticas avançadas, com fígado palpável e de consistência, superfície ou volume do lobo esquerdo alterados;
- c) forma hepatoesplênica duvidosa, com alterações à palpação do fígado e baço palpável somente à inspiração profunda;
- d) forma hepatoesplênica, com alterações à palpação do fígado e baço palpável abaixo do rebordo costal esquerdo;

- e) forma hepatoesplênica pós-cirúrgica, identificada pelas características da forma anterior e com antecedente de intervenções para correção da hipertensão portal;
- f) forma com hipertensão pulmonar.

A prevalência de formas graves (hepatointestinal com lesões hepáticas avançadas, hepatoesplênica duvidosa, hepatoesplênica e hepatoesplênica pós-cirúrgica) apresentou redução progressiva durante o seguimento de 29 anos. De 12,5% em 1976, observou-se queda para 4,5% em 2002. Nota-se ainda que a faixa etária mais acometida pelas formas graves modificou-se dos 30-34 anos até 1985, para os 55-59 anos na avaliação feita em 2002, sugerindo que a evolução para as formas avançadas foi cada vez mais rara entre os mais jovens (GUEVARA, 2005).

4.2 Pacientes

4.2.1 CENSO POPULACIONAL. A população estimada de Santa Maria da Vitória, segundo dados da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE em 2007 é de 40.571 habitantes (IBGE, 2007). Ao todo, 3.766 indivíduos residentes nos 17 povoados que formam a região de Brejo do Espírito Santo foram avaliados durante os 29 anos de seguimento (GUEVARA, 2005).

4.2.2. AMOSTRA. O presente trabalho é um estudo transversal realizado em outubro de 2004, em Brejo do Espírito Santo. Na ocasião, foram convidados a participar todos os indivíduos com dados atuais ou pregressos sugestivos de formas graves da esquistossomose e um grupo de indivíduos que nunca apresentaram sinais clínicos de formas graves. Dessa maneira, foi selecionada uma amostra de conveniência composta por 411 indivíduos entre três e 92 anos de idade. Os participantes foram identificados em três grupos:

- a) Grupo 1: 41 pacientes com dados clínicos atuais sugestivos de fibrose hepática, sendo 11 esplenectomizados.
- b) Grupo 2: 102 pacientes com história progressiva de fibrose hepática, mas sem dados atuais confirmatórios, sendo 17 esplenectomizados.
- c) Grupo 3: 268 indivíduos que nunca tiveram dados clínicos sugestivos de fibrose hepática.

O cálculo da amostra para a realização das dosagens dos marcadores de fibrose foi realizado estimando-se um erro α de 0,05, poder de diferenciação entre os grupos de 0,90 e razão de alocação de 1:1 (BROWNER *et al.*, 2006). Foi considerada uma diferença de cerca de 80% entre os grupos e uma variação de 100% em torno dos valores médios da concentração do ácido hialurônico obtidos da literatura (KÖPKE-AGUIAR *et al.*, 2002). Para permitir a diferenciação dos grupos sem acometimento hepático, com acometimento leve e intenso, cada grupo deveria ser composto por 20 indivíduos. Considerando o caráter do trabalho de campo e para melhor aproveitamento dos kits comerciais utilizados, tomou-se uma amostra que comportava perdas até maiores 20% em cada grupo e realizaram-se ao todo oitenta exames.

Após a realização da ultra-sonografia, oitenta pacientes foram selecionados e divididos em três grupos para a dosagem dos marcadores bioquímicos: o primeiro com fibrose leve, o segundo com fibrose moderada a intensa, e o grupo controle, sem fibrose. Nesta etapa da seleção, todos os indivíduos com idade menor que 18 anos foram excluídos porque os valores normais para crianças e adolescentes não correspondem aos valores para adultos.

A classificação quanto à presença e ao grau de fibrose seguiu a padronização adotada pela Organização Mundial de Saúde – OMS (NIAMEY WORKING GROUP, 2000) para a definição dos grupos de estudo. Oitenta e dois pacientes foram classificados como portadores de fibrose leve (C, D ou Dc), 37 como fibrose moderada (E ou Ec) e 10, fibrose intensa (F). Duzentos e setenta e quatro não tiveram diagnóstico de fibrose pelo US. Não havia informação de oito pacientes, três deles menores que 18 anos. Após a eliminação dos indivíduos que preenchiam critérios de exclusão para o estudo, os pacientes foram sorteados dentro de cada grupo para a composição da amostra: 23 pacientes do grupo com fibrose leve, 22 com fibrose moderada e seis com fibrose grave. Para o grupo controle foram sorteados 29 indivíduos. Caso o soro de um paciente sorteado não estivesse disponível, o próximo paciente de uma listagem em ordem alfabética do mesmo grupo era selecionado em substituição ao primeiro (FIG. 2). Um paciente foi excluído do grupo de fibrose moderada após o sorteio, pois à revisão do ultra-som o aspecto ecográfico foi considerado compatível com cirrose.

Crterios de inclusão: indivíduos com mais de 18 anos de idade, residentes em Brejo do Espírito Santo, com exame ultra-sonográfico do fígado normal ou portadores de hepatopatia exclusivamente esquistossomótica.

Crêterios de exclusão: menores de 18 anos e os portadores de cirrose hepática diagnosticada ao ultra-som.

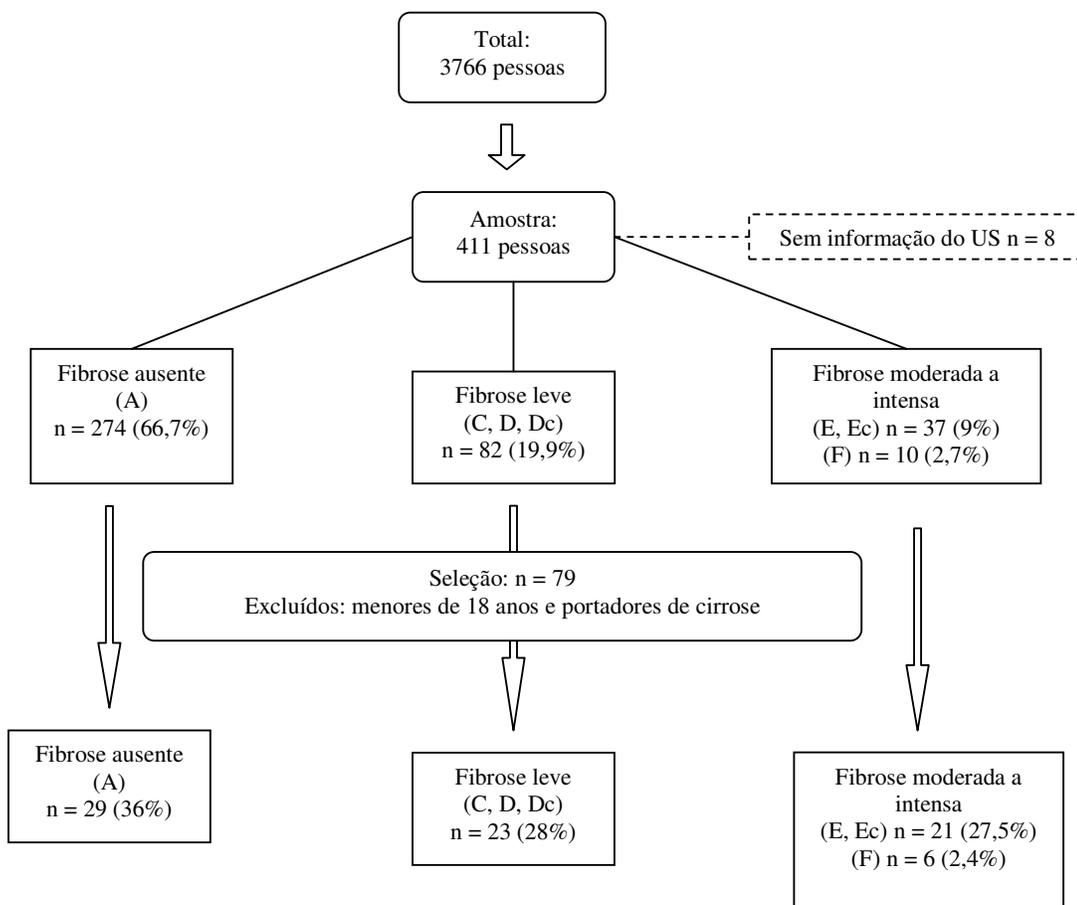


FIGURA 2 - Fluxograma da amostragem dos pacientes.

4.3 Métodos

4.3.1 EXAME CLÍNICO

Anamnese. A anamnese foi realizada através de questionário padronizado, aplicado por alunos de iniciação científica treinados, e verificado pelos médicos responsáveis pelo exame físico. Os dados coletados incluíram características clínico-epidemiológicas relacionadas à morbidade por esquistossomose e outras doenças hepáticas. Os pacientes foram questionados sobre tratamento prévio para esquistossomose, sangramento digestivo, hemotransfusão, injeções, tratamento odontológico prévio e ingestão de bebidas alcoólicas acima de 40g/dia (MAILLARD; SORREL, 2009) (ANEXO 5).

Exame físico. O exame físico foi realizado por dois médicos. Um dos examinadores foi o responsável pelos exames físicos dos pacientes em todas as avaliações da população durante o seguimento de 29 anos (GUEVARA, 2005). Em caso de discordância entre os examinadores, buscou-se o consenso e apenas um exame foi registrado para cada paciente. Foram registrados dados de ectoscopia, peso, altura e dados vitais, e uma avaliação cardiorrespiratória sumária. No exame do abdome, foi registrada a presença de ascite, circulação colateral e outros estigmas de doença hepática. A palpação do lobo direito do fígado foi realizada na linha hemiclavicular direita abaixo do rebordo costal e do lobo esquerdo do fígado abaixo do apêndice xifóide, ambos em decúbito dorsal. A palpação do baço foi realizada abaixo do rebordo costal esquerdo, em decúbito dorsal ou em posição de Schuster (SOUZA, 2004) (FIG. 3). Nos casos em que ultrapassava a referência óssea, a porção do órgão palpável abaixo desta foi medida em centímetros (FIG. 4). Nos casos em que fígado ou baço foram palpados, a avaliação de sua consistência foi registrada como normal ou endurecida. Nos casos de fígado palpável, foi registrada, além da consistência, a avaliação de sua superfície, se lisa ou nodular.



FIGURA 3 - Palpação do fígado. A. Prof. Aluizio Prata.
B. Prof. José Roberto Lambertucci.

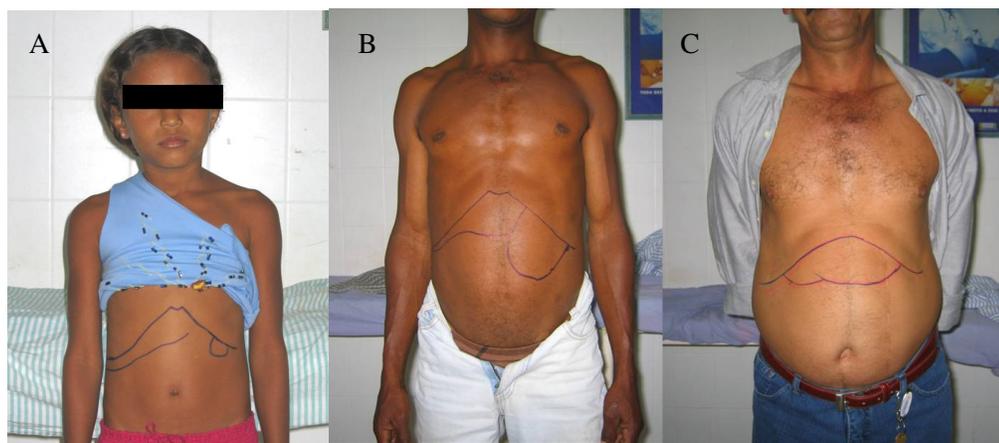


FIGURA 4 - A. Criança portadora de hepatoesplenomegalia, segundo o exame físico.
B. Paciente portador de hepatoesplenomegalia, segundo o exame físico. C. Paciente
esplenectomizado portador de hepatomegalia, segundo o exame físico.

4.3.2 ULTRA-SOM

A ultra-sonografia foi realizada por profissional treinado na aplicação do protocolo de Niamey-Belo Horizonte (NIAMEY WORKING GROUP, 2000 – ANEXOS 6 e 7). Foi utilizado aparelho portátil *GE Logic 100* (*GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido*), com transdutor convexo polifrequencial de 2,5 a 5 MHz, que permite o armazenamento dos exames em formato Dicom em dados brutos (protocolo específico para imagens médicas, sem perda de qualidade) para uma possível reavaliação (FIG. 5).

Os dados quantitativos registrados incluem a medida do diâmetro longitudinal dos lobos direito e esquerdo do fígado e do baço, a espessura da vesícula biliar, o calibre das veias porta, esplênica e mesentérica superior, a espessura da parede portal no hilo hepático e em sua bifurcação e a espessura da parede do ramo portal de segunda ordem, de acordo com o protocolo da OMS (ANEXO 7). Os dados qualitativos registrados são a presença de linfonodos, o aspecto do contorno hepático, a presença, distribuição e intensidade da fibrose periportal (ANEXO 6), a presença e o tipo de circulação colateral.

O padrão ouro para o diagnóstico de fibrose hepática foi o ultra-som. O diagnóstico da presença e a classificação dos padrões de fibrose pelas imagens sonográficas foram baseados nas pranchas esquemáticas preconizados pela OMS (NIAMEY WORKING GROUP, 2000) e na classificação subjetiva do grau de fibrose (COTA *et al.*, 2006; PINTO-SILVA *et al.*, 1994). A reprodutibilidade do exame não foi avaliada neste trabalho.



FIGURA 5 - Realização do exame ultra-sonográfico.

4.3.3 DOSAGEM DO ÁCIDO HIALURÔNICO E DO COLÁGENO IV

Foram colhidos cinco a 10ml de sangue de cada paciente por punção venosa realizada por pessoal treinado. O soro foi separado por centrifugação após coagulação, dividido em até três alíquotas e estocado a -20°C . As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo para o transporte até Belo Horizonte e, após a chegada, novamente armazenadas a -20°C até a realização da sorologia para hepatites virais e dosagens dos marcadores de fibrose.

A sorologia para hepatites incluiu o HBsAg, anticorpo antiHBc e antiVHC e foi realizada em um laboratório particular de Belo Horizonte. As dosagens dos marcadores de fibrose AH e C-IV foram realizadas no laboratório de Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para a análise, as alíquotas de soro foram deixadas em temperatura ambiente até o descongelamento.

Sorologias para hepatites virais. Para a determinação da prevalência de hepatite B foram realizadas as pesquisas por *ELISA* do HBsAg e anti-HBc (*HBs e AntiHBc EIA, Medical Biological Service, Milão, Itália*). Para a de hepatite C, foi pesquisado o antiVHC também pelo método *ELISA (Detect-HCV 3.0, Adaltis, Montreal, Canadá)*.

Dosagem do AH. O kit comercial *HA-ELISA*[®] (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, EUA) foi utilizado para a dosagem do AH. Os métodos imunológicos de dosagem do AH baseiam-se em sua afinidade por proteínas de ligação específicas (HASCAL; HEINEGÅRD, 1974). Neste método de ensaio enzimático competitivo, o AH contido em uma solução da amostra testada, liga-se à proteína marcada e inibe sua ligação com o AH aderido a uma superfície sólida. Desprezada a solução, revela-se o marcador da proteína aderida e faz-se a leitura inversa: quanto maior a quantidade aderida, menor a concentração do AH na solução testada. Ao ensaio radiométrico utilizado historicamente, seguiu-se o desenvolvimento do ensaio enzimático pela modificação do marcador da proteína de ligação (DELPECH; BERTRAND; MAINGONNAT, 1985; MARTINS *et al.*, 2003; WIESLANDER; HEINEGÅRD, 1980). Para a construção da curva-padrão utilizada como controle foram utilizadas soluções em diluições padronizadas de 50 a 1.600 ng/mL.

Dosagem do C-IV. O kit comercial *Collagen IV ELISA*[®], (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, EUA) foi utilizado para a dosagem do C-IV. A técnica *ELISA-sanduíche* é utilizada para a quantificação do C-IV solúvel no soro. Para a construção da curva-padrão utilizada como controle

foram utilizadas soluções em diluições padronizadas de 8 a 500 ng/mL. A intensidade da absorbância neste caso é diretamente proporcional à concentração de C-IV da amostra, determinada pela curva-padrão gerada por análise de regressão não-linear.

A leitura das reações colorimétricas foi realizada em um leitor de placas de *ELISA* (*EMax*[®] *Precision Microplate Reader*, *Molecular Devices*, Califórnia, EUA) em comprimento de onda de 405 nm para o AH e 450 nm para o C-IV. A transferência e análise dos dados foi feita pelo programa *SoftMax Pro 5* (*Molecular Devices*, Califórnia, EUA).

4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados específico para este estudo foi criado utilizando-se o programa *EpiData* versão 3.1 [Lauristen JM (editor) *Epi Data Entry, Data Management and Basic Statistical Analysis Sistem*, *Epi Data Association*, 2000-2006, disponível em: <http://www.epidata.dk>], para armazenamento dos dados coletados. Os dados foram importados e analisados através do pacote estatístico *SPSS* versão 12.0 para *Windows* - *SPSS Incorporation*, Chicago, Illinois, EUA, 2005, disponível no Laboratório de Informática do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

A análise descritiva das variáveis categóricas incluiu a distribuição de frequências. As diferenças de proporções foram verificadas pelo teste do *qui*² com correção de Yates ou teste exato de Fisher quando apropriado. As variáveis contínuas foram analisadas pelas medidas de tendência central e as comparações foram dadas pelo teste *t* de *Student* para variáveis com distribuição normal ou teste de *Kruskall-Wallis*, nos demais casos. A análise da concordância entre métodos foi avaliada pelo teste *kappa*.

A comparação dos níveis de AH e C-IV entre os grupos foi realizada pela análise de variâncias (ANOVA). A existência de subgrupos homogêneos foi verificada pelo teste de Tamhane para os dados não paramétricos e Bonferroni para os demais. A avaliação da simetria e distribuição das variáveis foi feita pelas medidas de Kurtosis e Skewness, além da inspeção visual dos gráficos de dispersão e histograma. Foi necessária a transformação logarítmica da variável AH, que apresentou distribuição diferente da normal.

Curvas ROC. A metodologia da curva *ROC* foi utilizada para a definição da acurácia diagnóstica e do melhor valor de corte para o AH na previsão da existência de fibrose. Essa curva é uma representação gráfica da sensibilidade *versus* um menos a especificidade de todos os valores medidos e permite a escolha do valor mais apropriado para definir um teste positivo. A *AUC* significa a acurácia do índice para diagnosticar um caso positivo e varia de zero a um. Uma *AUC* de 0,5, igual a uma linha diagonal partindo do ponto 0,0, indica que o índice não tem poder de predição. Uma *AUC* igual a um indica um perfeito poder de predição (ZHOU; OBUCHOWSKI; McCLISH, 2002).

Análise univariada e multivariada. A regressão linear múltipla foi utilizada para construção de modelos explicativos do aumento da concentração do AH após a transformação logarítmica. As variáveis foram incluídas no modelo pelo método progressivo de entrada (*forward*).

Os dados clínicos avaliam o acometimento hepático pela esquistossomose pelo seu aumento de tamanho e consistência endurecida. As variáveis correspondentes são a ‘distância do fígado ao rebordo costal direito’, ‘distância do fígado ao apêndice xifóide’, a ‘distância do baço ao rebordo costal esquerdo’, a ‘consistência do fígado’ e a ‘consistência do baço’. Os dados do exame de imagem descrevem a presença e a intensidade da fibrose, bem como os sinais indiretos de hipertensão portal. As variáveis ultra-sonográficas correspondentes são: o ‘diâmetro longitudinal do baço’, diâmetro longitudinal do lobo direito do fígado’, diâmetro longitudinal do lobo esquerdo do fígado’, o ‘grau de fibrose’, a ‘distribuição da fibrose’, o ‘padrão de fibrose pelo padrão da OMS’, a ‘espessura da parede da vesícula’, o ‘espessamento da veia porta no hilo’, o ‘espessamento da veia porta bifurcação’, a ‘espessura dos ramos de segunda ordem da veia porta’, o ‘calibre da veia porta pré-hepática’, o ‘calibre da veia esplênica’, o ‘calibre da veia mesentérica superior’ e a ‘presença de colaterais’ (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001a; PINTO-SILVA *et al.*, 1994).

A análise das correlações utilizou os coeficientes de Pearson para as variáveis contínuas e de Spearman para os dados não paramétricos. A análise univariada foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student* para as variáveis contínuas e o teste do qui^2 para as variáveis categóricas. Variáveis com o nível de significância (*p*) menor que 0,20 foram incluídas na modelagem, além de variáveis de importância reconhecida na literatura. A variável idade tem sabida influência na concentração do ácido hialurônico (FRASER *et al.*, 1997). O índice de massa corporal relaciona-se com a ocorrência de esteato-hepatite não alcoólica, conhecido fator de risco para fibrose hepática e aumento dos níveis de ácido hialurônico (SAKUGAWA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2005).

A significância estatística dos modelos de regressão linear múltipla (R^2) foi dada pelo teste da variação de F considerando-se significativa uma variação com $p < 0,05$, e pelo intervalo de confiança de 95% para os coeficientes. A distribuição das variáveis contínuas foi verificada através da inspeção dos gráficos de resíduos. Dados com distribuição não normal foram analisados após transformação logarítmica. Os dados inexistentes foram excluídos aos pares. Não foram observados valores externos ou extremos.

4.4 Considerações éticas

O projeto “Avaliação ultra-sonográfica da lesão hepática da esquistossomose mansoni em área de alta prevalência no Estado da Bahia e sua correlação com marcadores bioquímicos de fibrose” foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO 1) e pela Secretaria Municipal de Saúde de Santa Maria da Vitória (ANEXO 2) e registrado no SISNEP – Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP CAAE nº0140.0.203.000-05).

O Laboratório de Imunofarmacologia do ICB, UFMG, e o Laboratório Micra atestaram por escrito sua concordância e participação no projeto (ANEXOS 3 e 4)

Todos os participantes foram informados e forneceram consentimento por escrito para a inclusão na pesquisa (ANEXO 5). Foi obtido consentimento dos pais ou responsáveis legais para a participação dos menores e da própria criança ou adolescente quando apropriado, conforme Resolução 196/96.

Todos os procedimentos (exame clínico, ultra-som e coleta e processamento das amostras de sangue) foram realizados no hospital do Município de Santa Maria da Vitória, com a concordância da autoridade de saúde local. O transporte dos pacientes de sua localidade de residência até o hospital municipal e de volta foi oferecido gratuitamente pela equipe de pesquisa.

Os métodos propedêuticos utilizados na investigação – exame físico e ultra-sonográfico – não oferecem quaisquer riscos aos participantes. A coleta de sangue foi realizada seguindo rotinas apropriadas, com materiais descartáveis, garantindo risco mínimo aos indivíduos.

Todas as informações obtidas neste estudo foram utilizadas exclusivamente no cumprimento dos objetivos propostos e mantidas sob os princípios da confidencialidade e privacidade. A

identificação de diagnósticos alternativos por quaisquer dos métodos empregados desencadeou medidas específicas de assistência.

4.5 Revisão bibliográfica

O levantamento bibliográfico foi feito primariamente através de levantamento em bases eletrônicas de dados MEDLINE e Scielo utilizando o cruzamento de palavras-chave. Foram utilizados os termos “*liver fibrosis*”, “*schistosomiasis*”, “*fibrosis markers*”, “*serum markers*”, “*biochemical markers*”, “*type IV collagen*”, “*hyaluronic acid*”. Trabalhos experimentais e estudos em humanos foram recuperados e analisados em publicações especializadas, seriadas e isoladas, livros, teses e referências legislativas.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Características clínicas. Trinta e oito (47,5%) dos 79 pacientes incluídos na análise dos marcadores de fibrose eram do sexo masculino. A idade variou de 21 a 82 anos, com média de 49 ($\pm 13,4$) anos. A média do índice de massa corporal (IMC kg/m²) foi de 22,1 ($\pm 3,0$) com mínimo de 16 e máximo de 31. Doze (15%) pacientes foram classificados como brancos. Dados clínicos e epidemiológicos são apresentados na TAB. 1. A ocorrência de sangramento digestivo e hemotransusão foi mais frequente entre os pacientes portadores de fibrose moderada e intensa, com diferença estatisticamente significativa pelo teste do qui quadrado. Essas ocorrências representam complicações da hipertensão portal, característica dos pacientes com doença mais avançada.

TABELA 1 – Características clínicas e epidemiológicas da amostra de 79 indivíduos selecionada para a realização da dosagem dos marcadores de fibrose em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004

	Fibrose n(%)					p
	Total	Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
	n = 79	A* n = 29	C, D, Dc* n = 23	E, Ec* n = 21	F* n = 6	
<i>Características**</i>						
Tratamento prévio esquistossomose	60(76)	22(76)	14(78)	20(95)	4(67)	0,047
Sangramento digestivo	16(20)	2(7)	4(17)	9(82)	1(17)	0,018
Hemotransusão	16(20)	2(7)	4(17)	8(38)	2(33)	0,027
Abuso de álcool	23(29)	9(31)	7(30)	4(24)	3(50)	0,704
Ovos de <i>S. mansoni</i> no EPF	1(1)	-	-	1(5)	-	0,594
Outros parasitas intestinais	37(47)	14(48)	9(39)	10(48)	4(67)	0,849
Hepatite C (anti-VHC positivo)	1(1)	-	1(4)	-	-	0,633
Hepatite B (HbsAg positivo)	1(1)	1(3)	-	-	-	1,000
(Anti-HBc positivo)	11(14)	3(10)	2(9)	6(28)	-	0,194

* Padrões de fibrose ao ultra-som (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). ** teste exato de Fisher

Ultra-som. Assim como os marcadores clínicos de hipertensão portal, também foi observada maior frequência das alterações ultra-sonográficas da hipertensão portal entre os pacientes com fibrose moderada e intensa, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As variáveis relacionadas à hipertensão portal analisadas foram: diâmetro do baço aumentado, calibre das veias porta e esplênica aumentados (TAB. 2). A análise das diferenças entre os grupos é mostrada nas TAB. 13, 14, 15 e 16 (APÊNDICE). Apenas um (1%) paciente, com fibrose moderada, apresentou linfonodos abdominais.

TABELA 2 - Características ultra-sonográficas dos 79 indivíduos selecionados para a realização da dosagem dos marcadores de fibrose em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004

	Fibrose n (%)					p
	Total n = 79	Ausente A* n = 29	Leve C, D, Dc* n = 23	Moderada E, Ec* n = 21	Intensa (F)* n = 6	
<i>Características**</i>						
Contorno hepático irregular	7(9)	-	2(9)	3(14)	2(33)	0,021
Circulação colateral	8(10)	-	-	7(33)	1(17)	0,000
Diâmetro do baço > 120 mm	16(20)	1(3)	2(9)	11(52)	2(33)	0,000
Calibre veia porta > 12 mm	13(16)	-	2(9)	11(52)	-	0,000
Calibre veia esplênica > 9 mm	18(23)	-	1(4)	14(67)	3(50)	0,000
<i>Outros achados ao ultra-som</i>						
Colecistolitíase	3(4)	2(7)	1(4)	-	-	
Esplenectomia	6(8)	-	2(9)	4(19)	-	
Trombose da veia porta	2(2)	-	-	1(4)	1(17)	
Esteatose	3(4)	3(10)	-	-	-	
Parênquima heterogêneo	5(6)	-	1(4)	4(19)	-	
Corpos sideróticos esplênicos	2(2)	-	-	1(4)	1(17)	
Hamartomas biliares	2(2)	1(3)	1(4)	-	-	
Cisto renal	1(1)	-	1(4)	-	-	

* Padrões de fibrose ao ultra-som (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). ** teste exato de Fisher

A distribuição dos pacientes de acordo com o grau de fibrose pelos padrões da OMS e pela avaliação subjetiva do examinador é apresentada no GRÁF. 4 (APÊNDICE). Houve excelente concordância entre os métodos OMS e subjetivo de avaliação da fibrose ao ultra-som. O coeficiente *kappa* após o agrupamento dos padrões da OMS em fibrose ausente ('A'), leve ('C, D, e Dc'), moderada ('E, Ec') e intensa ('F') foi 0,96 ($p = 0,000$) (TAB. 3). As análises seguintes – comparação entre os grupos de fibrose das concentrações de AH e C-IV e a curva *ROC* – foram realizadas também para a avaliação subjetiva da fibrose, com resultados similares. As ilustrações são apresentadas no APÊNDICE (TAB. 10, 11 e 12, e GRÁF. 6 e 7).

TABELA 3 – Concordância entre os métodos de avaliação ultra-sonográfica da fibrose hepática, pelos padrões da Organização Mundial de Saúde e subjetivo, em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004

	Padrões de fibrose*				Total
	A	C, D ou Dc	E ou Ec	F	
<i>Fibrose</i>					
Ausente	29	0	0	0	29
Leve	0	23	2	0	25
Moderada	0	0	19	0	19
Intensa	0	0	0	6	6
Total	29	23	21	6	79

* Padrões de fibrose ao ultra-som (NIAMEY WORKING GROUP, 2000)

***kapa*: 0,96 ($p=0,000$)

5.2 Ácido hialurônico

Os níveis de ácido hialurônico variaram de 72,3 a 1074,9 ng/ml, com mediana [p(25%-75%)] de 152,6 (117,0-230,1) ng/ml, e média (\pm desvio padrão) de 200,1 (\pm 152,7) ng/ml. A variável apresentou distribuição diferente da normal. Por isso, para a análise e interpretação dos dados, foi realizada sua transformação pelo logaritmo neperiano (GRÁF. 5 – APÊNDICE). A concentração do ácido hialurônico foi comparada com o diagnóstico de fibrose pelos padrões da OMS após agrupamento em fibrose ausente ('A'), leve ('C, D e Dc'), moderada ('E e Ec') e intensa ('F').

Comparação entre as medianas. Não se observou distribuição homogênea das variâncias ($p = 0,011$). A comparação das medianas mostrou diferença significativa entre os grupos, com o nível mais alto no grupo da fibrose intensa ($F = 39,42$; $p = 0,000$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos sem fibrose e aqueles com fibrose de qualquer grau. Porém, entre os indivíduos com fibrose houve diferença significativa apenas entre pacientes com fibrose leve e intensa (GRÁF. 1, TAB. 4).

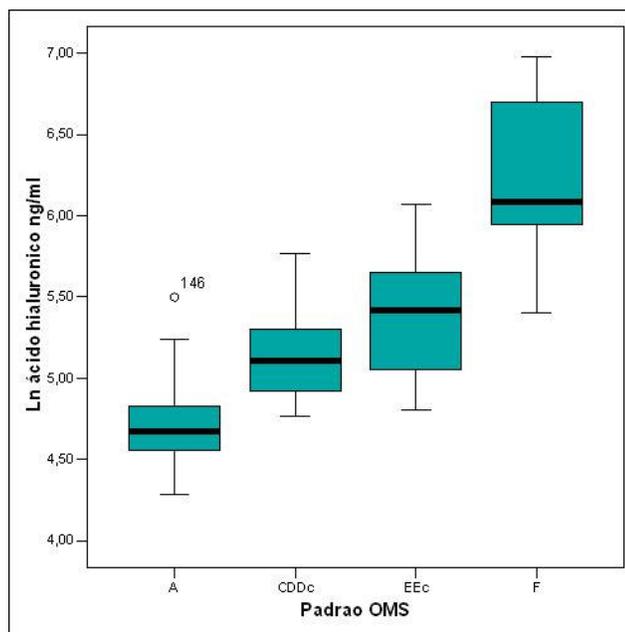


GRÁFICO 1 - Concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde

TABELA 4 – Comparação das medianas da concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde[§]

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	<i>p</i>
Entre grupos	13,172	3	4,391	39,416	0,000
Dentro dos grupos	8,354	75	0,111	-	-
Total	21,526	78	-	-	-
A x CDDc**	-	-	-	-	0,000
A x EEc**	-	-	-	-	0,000
A x F**	-	-	-	-	0,000
CDDc x EEc**	-	-	-	-	0,082
CDDc x F**	-	-	-	-	0,029
EEc x F**	-	-	-	-	0,090

[§]ANOVA. * grau de liberdade. ** Teste não paramétrico para variâncias não homogêneas ($p = 0,011$)

Curva ROC. A acurácia do ácido hialurônico, representada pela área sob a curva *ROC* (*AUC*) (IC 95%) para diagnosticar a presença de fibrose foi de 0,89 (0,82 – 0,97) (GRÁF. 2). A concentração de 115,4 ng/ml identificou os pacientes com fibrose com sensibilidade (*S*) de 98% e especificidade (*Es*) de 64% (TAB. 9 – APÊNDICE).

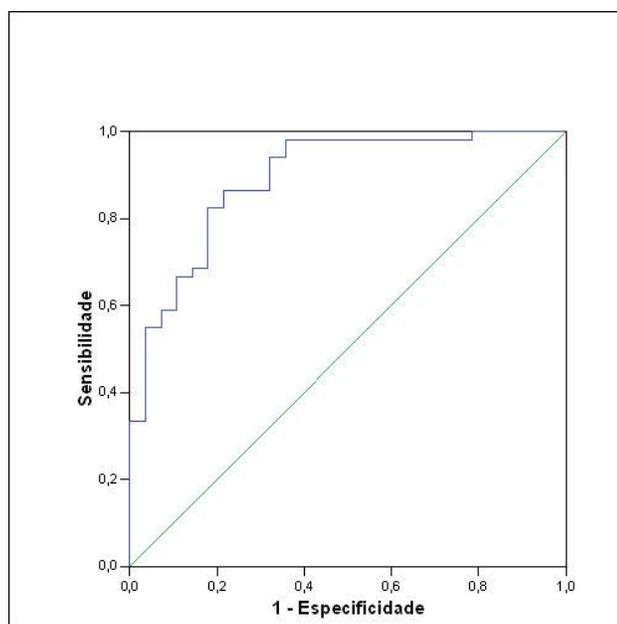


GRÁFICO 2 - Curva *ROC*: ácido hialurônico.
AUC: 0,89 (IC 95% 0,82 - 0,97).

5.3 Colágeno IV

Os níveis de C-IV variaram de 234,8 a 1549,4 ng/ml na amostra, com e média (\pm dp) de 798,5 (\pm 300,9) ng/ml. A variável apresentou distribuição semelhante à normal.

A comparação entre as médias da concentração do C-IV de acordo com a classificação pela OMS não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de intensidade da fibrose ($F = 0,963$; $p = 0,415$) (GRÁF. 3 TAB. 5).

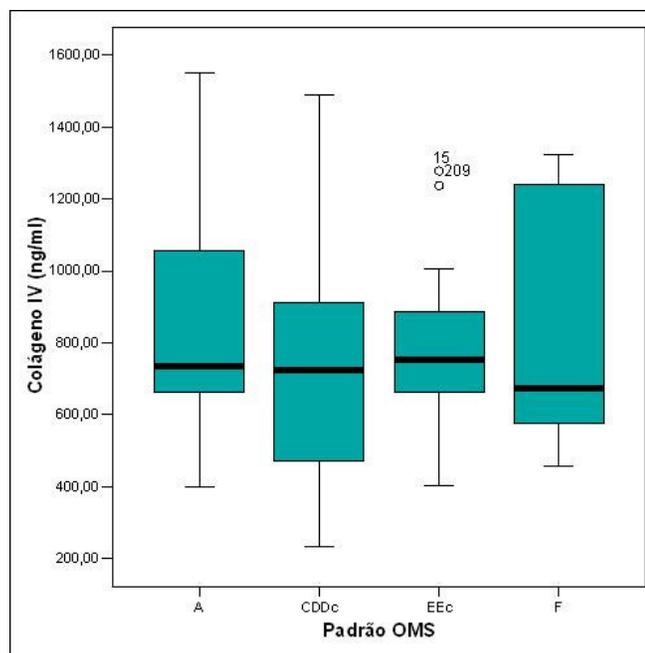


GRÁFICO 3 - Concentração do colágeno IV de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde

TABELA 5 – Comparação das médias das concentrações do colágeno IV de acordo com a classificação da fibrose pela Organização Mundial de Saúde[§]

	Soma dos quadrados	gl*	Média dos quadrados	F	<i>p</i>
Entre grupos	262090,789	3	87363,596	0,963	0,415
Dentro dos grupos	6802900,110	75	90705,335	-	-
Total	7064990,899	78	-	-	-

[§] ANOVA. * grau de liberdade

5.4 Análise das variáveis relacionadas à concentração do ácido hialurônico

As medidas de tendência central e dispersão, e os coeficientes de correlação (r) das variáveis do estudo com a concentração do AH são apresentados na TAB. 6. Todas as variáveis que apresentaram coeficiente de correlação com o AH significativo foram incluídas na modelagem inicial. A TAB. 7 apresenta as variáveis incluídas no modelo final, seus coeficientes e nível de significância. A seqüência dos modelos de regressão linear múltipla é resumida na TAB. 17 (APÊNDICE).

As variáveis incluídas no modelo inicial foram progressivamente excluídas de acordo com a perda de significância durante a modelagem. Os primeiros modelos mantinham significância apenas para a presença de fibrose periportal de acordo com a avaliação subjetiva. As variáveis inicialmente excluídas correspondem às que trazem menor precisão diagnóstica: palpação dos órgãos abdominais e a medida dos órgãos abdominais pela distância até os rebordos costais. A seguir foram excluídas as variáveis quantitativas do ultra-som: medidas do fígado e baço, calibre das veias e espessura das paredes dos vasos, que podem se modificar pelo estado hemodinâmico ou pela variação dos locais escolhidos para medida pelo examinador. Os modelos apresentavam poder explicativo persistentemente baixo, representado pelo baixo coeficiente R^2 ajustado (0,54).

De acordo com a regressão múltipla, o modelo explicativo mais eficiente para a elevação da concentração de AH entre os pacientes estudados incluiu as variáveis fibrose periportal, idade e presença de colaterais, com coeficiente R^2 ajustado de 0,625.

A presença de fibrose periportal no modelo explicativo é compatível com a hipótese inicial de que o aumento do AH está relacionado ao processo de fibrose do fígado. A inclusão da presença de colaterais como variável explicativa sugere que o aumento do AH também está relacionado à presença de hipertensão portal. A presença da idade no modelo sugere que o aumento do AH seja também relacionado ao aumento da idade. O modelo final pode ser descrito matematicamente como:

$$[AH] = 4,243 + (0,336 \times \text{fibrose periportal}) + (0,01 \times \text{idade}) + (0,316 \times \text{colaterais}).$$

TABELA 6 – Coeficientes de correlação (*r*) das variáveis do estudo com a concentração do ácido hialurônico

	n (%)	Média (± dp)	Mediana (25%-75%)	mín	máx	<i>r</i>	<i>p</i>
Idade (anos) *	79 (100)	49,3 (13,4)	48 (39-58)	21	82	0,299	0,008
IMC (kg/m ²) *	79 (100)	22,1 (3,0)	21,5 (20,2-24,5)	16,0	31,2	0,031	0,789
Distância fígado ao RCD (cm) *	36 (46)	2,4 (0,7)	2 (2-3)	1	4	0,107	0,535
Distância fígado ao apêndice xifóide (cm) *	39 (49)	5,5 (1,6)	5 (4-7)	2	9	0,508	0,001
Distância baço ao RCE (cm) *	29 (37)	3,9 (2,7)	3 (2-5)	1	12	0,202	0,293
Diâmetro lobo direito do fígado (mm) *	77 (97)	110,6 (23,0)	108 (97-127)	63	176	-0,453	0,000
Diâmetro lobo esquerdo do fígado (mm) *	79 (100)	82 (21,0)	82 (68-99)	22	123	-0,288	0,010
Diâmetro longitudinal do baço (mm) *	70 (89)	101 (36,9)	92,5 (75,7-119,2)	40	191	0,390	0,001
Calibre veia porta (mm) *	76 (96)	10,6 (2,7)	11 (9-12)	5	21	0,314	0,006
Calibre veia esplênica (mm) *	73 (92)	7,4 (2,5)	7 (6-8)	4	20	0,315	0,007
Calibre veia mesentérica superior (mm) *	77 (97)	8,4 (2,4)	8 (7-9)	4	17	0,526	0,000
Espessamento da veia porta no hilo (mm) *	76 (96)	5,4 (3,7)	4 (3-7)	1	20	0,599	0,000
Espessamento da veia porta na bifurcação (mm) *	77 (97)	5,5 (3,4)	4 (3-7)	2	20	0,661	0,000
Espessura ramos de segunda ordem (mm) *	79 (100)	3,5 (1,9)	3 (2-5)	1	11	0,615	0,000
Espessura parede da vesícula (mm) *	76 (96)	6,3 (4,8)	4 (3-9)	1	27	0,708	0,000
Fígado de consistência endurecida**	36 (45)	-	-	-	-	0,337	0,045
Baço de consistência endurecida**	26 (33)	-	-	-	-	0,267	0,188
Fibrose periportal (leve, moderada, intensa) **	79 (100)	-	-	-	-	0,734	0,000
Padrões da OMS**	79 (100)	-	-	-	-	0,723	0,000
Presença de colaterais **	65 (82)	-	-	-	-	0,412	0,001

* Pearson. **Spearman. RCD: rebordo costal direito. RCE: rebordo costal esquerdo. OMS: Organização Mundial de Saúde

TABELA 7 – Variáveis explicativas da variação da concentração do ácido hialurônico nos portadores de fibrose, em Brejo do Espírito Santo, Bahia, outubro de 2004

Variável	Coefficiente	Erro padrão	IC 95%	t	p
Constante	4,243	0,157	3,927 - 4,557	26,940	0,000
Fibrose periportal	0,336	0,049	0,237 - 0,434	6,823	0,000
Idade	0,010	0,003	0,004 - 0,016	3,259	0,002
Colaterais	0,316	0,135	0,45 - 0,583	2,337	0,023

R² ajustado: 0,625

5.5 Comparação dos marcadores de fibrose com sinais clínicos e ultra-sonográficos de hipertensão portal

Correlações. O AH apresentou correlação positiva e significativa com o diagnóstico ultra-sonográfico de hipertensão portal (TAB. 6).

Os níveis de AH e o C-IV foram comparados entre os grupos formados de acordo com o diagnóstico clínico e ultra-sonográfico da forma hepatoesplênica. As variáveis utilizadas foram a palpação do baço, a medida do baço pelo US [valor de referência (VR) ≤ 120 mm], o calibre das veias porta (VR ≤ 12 mm) e esplênica (VR ≤ 9 mm), e a presença de colaterais. O C-IV não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhuma das comparações.

A comparação das médias da concentração do AH entre os pacientes com diagnóstico da forma hepatoesplênica pelo exame físico, baço palpável ou não palpável, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Já a comparação das médias de acordo com o diagnóstico de hipertensão portal pelo ultra-som, considerando o aumento do baço, o calibre das veias porta e esplênica, e a presença de colaterais, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas para o AH (TAB. 8).

TABELA 8 – Comparação das médias das concentrações do ácido hialurônico e do colágeno IV de acordo com o diagnóstico clínico e ultra-sonográfico de hipertensão portal[§]

		F	p
<i>Ácido hialurônico</i>	Palpação do baço	2,830	0,097
	Diâmetro do baço	6,877	0,011
	Calibre da veia porta	6,125	0,016
	Calibre da veia esplênica	15,230	0,000
	Presença de circulação colateral	12,158	0,001
<i>Colágeno IV</i>	Palpação do baço	2,767	0,100
	Diâmetro do baço	0,960	0,757
	Calibre da veia porta	0,032	0,859
	Calibre da veia esplênica	0,525	0,471
	Presença de circulação colateral	0,014	0,906

[§] ANOVA

A acurácia diagnóstica e as curvas *ROC* do ácido hialurônico para as variáveis que mostraram diferença significativa entre as médias são apresentadas na TAB. 18 e no GRÁF. 8.

6. DISCUSSÃO

Verificou-se neste trabalho a elevação das concentrações do AH no soro de pacientes residentes em área endêmica para esquistossomose, com fibrose hepática diagnosticada pelo ultra-som. O AH mostrou ótima acurácia diagnóstica para a presença da fibrose hepática, mas não foi capaz de detectar as diferenças entre os graus de fibrose na amostra estudada. O AH teve correlação positiva e significativa com o diagnóstico ultra-sonográfico de fibrose e de hipertensão portal. O diagnóstico subjetivo da intensidade da fibrose pelo radiologista, a idade e a presença de circulação colateral foram independentemente associadas à concentração do AH pela análise multivariada. Não houve correlação entre os níveis de C-IV e a presença ou intensidade da fibrose na amostra estudada.

Os níveis do ácido hialurônico foram comparados com a classificação ultra-sonográfica da fibrose hepática da esquistossomose mansônica em estudos anteriores à publicação das recomendações da OMS contendo as pranchas esquemáticas para classificação da fibrose pelo ultra-som (NIAMEY WORKING GROUP, 2000). Esses estudos obtiveram resultados conflitantes. Ricard-Blum *et al.*, (1999) encontraram correlação entre os níveis de ácido hialurônico e escores ultra-sonográficos de fibrose em estudo de área endêmica em Madagascar. Burchard *et al.* (1998), ao contrário, não identificaram correlação entre o AH e o grau de fibrose ao US, e sugeriram que a elevação do AH em outras doenças hepáticas fibrosantes estaria relacionada às alterações da função hepática ou à atividade inflamatória, supostamente inexistentes na esquistossomose. A elevação do AH em presença de atividade inflamatória no parênquima hepático foi investigada em indivíduos portadores de hepatites virais e esquistossomose. Os resultados mostraram uma elevação do AH preferencialmente correlacionada com o processo fibrótico, mesmo em vigência de atividade inflamatória concomitante (EBOUMBOU *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2005; PASCAL *et al.*, 2000; TAO *et al.*, 2003). Estes achados sugerem que o AH tem valor no diagnóstico da fibrose hepática decorrente da esquistossomose.

Apenas um estudo, realizado em centro de referência em São Paulo, analisou a acurácia diagnóstica do AH através da curva ROC em portadores de esquistossomose (KÖPKE-AGUIAR *et al.*, 2002). O estudo utilizou o ultra-som e a endoscopia para a classificação de pacientes portadores de esquistossomose em dois grupos, com e sem hipertensão portal. Um grupo comparativo de pacientes cirróticos foi incluído. Foi demonstrada a utilidade do

AH como marcador evolutivo da forma clínica da esquistossomose, com acurácia diagnóstica dada pela *AUC* de 0,78 para a forma hepatoesplênica.

No presente estudo é descrita uma correlação positiva e significativa entre o AH e o diagnóstico ultra-sonográfico da fibrose e da hipertensão portal. A maior acurácia diagnóstica do AH, no entanto, foi para a identificação da presença de fibrose, com *AUC* de 0,96 (TAB. 22 – APÊNDICE). A fibrose é caracterizada pela deposição de componentes da matriz extracelular, entre eles o ácido hialurônico. Ela é consequência da modulação imunológica e reparo tecidual frente à reação granulomatosa crônica induzida pelos ovos do *S. mansoni* nos vasos e tecido perivascular (LENZI *et al.*, 1998; 1999; WYNN *et al.*, 2004). A depuração do AH está relacionada com a função endotelial (FRASER *et al.*, 1986). Os níveis elevados do AH em pacientes com fibrose poderiam sinalizar o declínio da função endotelial secundária à obstrução e inflamação vascular crônica pelos ovos. A hipertensão portal representaria, nesse caso, uma consequência do mesmo processo de lesão vascular.

A hemorragia digestiva por ruptura de varizes esofágicas é a manifestação clínica mais temida da hipertensão portal, pela alta mortalidade nos eventos. Nos pacientes estudados, a maior frequência de sangramento digestivo foi observada entre os pacientes com fibrose mais intensa (16 de 78 pacientes, 10 entre os portadores de fibrose moderada e intensa), embora não existam dados endoscópicos para a confirmação da origem esofágica dos eventos registrados. Esse dado é favorável a uma associação entre a intensidade da fibrose e a hipertensão portal. Há registros na literatura do uso do US para prever o risco de hemorragia digestiva. Richter *et al.* (1992c) identificaram correlação positiva entre os escores de fibrose obtidos pela medida do espessamento da parede e dilatação da veia porta, e o risco de sangramento. Outro estudo identificou a associação independente do diâmetro aumentado do baço e da fibrose periportal com o risco aumentado de ruptura de varizes (ELTOUM *et al.*, 1994).

A célula estrelada, transformada em miofibroblasto após a ativação, é a principal efetora da fibrogênese. Ativada, a célula produz os componentes da matriz extracelular, as citocinas, fatores de crescimento e peptídeos vasogênicos que atuam na reparação tecidual, além de expressar proteínas musculares contráteis. Pela presença das fibras contráteis ela torna-se responsiva aos efeitos vasoativos das endotelinas, angiotensina II e óxido nítrico. Essas substâncias, no entanto, são também ativadoras da célula estrelada e induzem a produção

dos componentes da matriz extracelular, bem como sua própria produção pela célula ativada (ROCKEY, 2003).

A atuação dos peptídeos vasoativos tem sido implicada na fisiopatologia da hipertensão porta relacionada à cirrose, mas na esquistossomose as investigações são ainda incipientes. Toledo et al. (2008) estudaram os fatores endoteliais – endotelinas (ET) 1 e 3, fator de von Willebrand e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em portadores de esquistossomose, com e sem hipertensão portal. Os níveis das ET-1 e ET-3 mostraram correlação com o aumento do baço e diâmetro da veia esplênica. A ET-3 foi capaz de identificar os pacientes com hipertensão portal com uma *AUC* de 0,92.

Os kits comerciais do ensaio imunoenzimático por competição, utilizados neste trabalho, contam com a padronização industrial e têm a vantagem de não empregar reagentes radioativos como os ensaios radiométricos previamente utilizados (BURCHARD *et al.*, 1998; RICARD-BLUM *et al.*, 1999). Köpke-Aguiar *et al.* (2002) utilizaram um método de dosagem em sanduíche desenvolvido *in house*. O nível de corte de 20 µg/l (equivalente a 20ng/ml) relatado por aqueles autores difere do nível aqui encontrado para o diagnóstico da fibrose, 115,4 ng/ml. O trabalho anterior utiliza o ponto de corte para identificar pacientes portadores de hipertensão porta, enquanto o presente trabalho atribui ao valor de corte encontrado à capacidade de distinguir os pacientes portadores de fibrose. Por causa dessas diferenças conceituais, a discordância não pode ser atribuída puramente às diferenças entre os métodos. Todavia, as diferenças de acurácia diagnóstica devem ser interpretadas com cautela. O AH é um componente principal da matriz extracelular e aumenta substancialmente na fibrose hepática de qualquer etiologia (FRIEDMAN, 1993). Em vista disso, o presente trabalho teve o objetivo de testar a capacidade dos marcadores bioquímicos para diagnosticar a fibrose em uma área endêmica, através da comparação dos seus níveis com o exame ultra-sonográfico. A menor acurácia para identificar a hipertensão portal sugere que esta característica clínica não seria diretamente determinada, embora associada, com o grau de fibrose.

Cabe comentar a análise da curva ROC para o AH com relação aos valores de sensibilidade e especificidade. A ubiquidade do AH nos tecidos relacionada à sua característica de componente da matriz extracelular torna esta molécula um marcador de atividade fibrogênica em virtualmente todas as doenças fibrosantes. A acurácia diagnóstica de uma variável contínua em um dado evento de interesse, deriva da representação gráfica da

sensibilidade *versus* um menos a especificidade dos valores medidos. A especificidade traduz a probabilidade de encontrar um teste negativo em pacientes que não apresentem o evento de interesse de acordo com o teste de referência. Aqui, o nível de AH teve alta sensibilidade, mas especificidade somente aceitável para o diagnóstico da fibrose hepática, o que traduz a característica do marcador em teste. Ainda assim, uma análise desse resultado situa o AH como potencial método de rastreamento da fibrose hepática. A característica da população estudada e a prevalência local da doença permitem identificar através da elevação do AH os pacientes que devem ser submetidos a exames específicos capazes de identificar a presença de acometimento hepático e precisar os níveis de morbidade de cada indivíduo.

Outro dado interessante é a inclusão, no modelo explicativo da concentração do AH, de uma variável relacionada à hipertensão portal (presença de colaterais), juntamente com a fibrose periportal. Ainda não é possível afirmar uma relação temporal ou de causa e efeito entre a progressão da fibrose hepática da esquistossomose e a hipertensão portal. Mas a identificação do envolvimento das substâncias vasoativas nos dois processos abre perspectivas instigantes para o preenchimento desta lacuna do conhecimento.

Não existem relatos da comparação da concentração do AH com a histologia hepática em humanos portadores de esquistossomose mansônica. Contudo, a acurácia do AH no diagnóstico da fibrose em comparação com a histologia, em hepatopatias fibrosantes com indicação de estadiamento histológico, é amplamente descrita. Os resultados são consistentes e demonstram confiabilidade no diagnóstico da existência e gravidade da fibrose na avaliação de portadores de hepatites virais (GUÉCHOT *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 2002), hepatopatia alcoólica (PARÉS *et al.*, 1996; STICKEL *et al.*, 2003) e esteato-hepatite não alcoólica (SAKUGAWA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2005). Estas evidências corroboram a utilização do AH no diagnóstico da presença e intensidade da fibrose hepática de diferentes causas. Contudo, no presente estudo o AH não foi capaz de detectar a progressão da fibrose. Estudos comparando o ultra-som com a histologia para o diagnóstico da fibrose, embora demonstrem alta confiabilidade do diagnóstico ultra-sonográfico da presença da fibrose, apontam também a imprecisão do método para a graduação da intensidade da fibrose (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1992; HOMEIDA *et al.*, 1988, TEIXEIRA, 2007).

Faz-se imperioso discutir o emprego do ultra-som como padrão-ouro na avaliação dos marcadores sorológicos de fibrose hepática como método diagnóstico na esquistossomose. Comparações recentes do ultra-som com a RM e com a biópsia hepática têm questionado o significado das alterações encontradas pelo ultra-som, principalmente sua correspondência com a presença e quantidade de tecido fibrótico. Mais do que isso, a RM identifica sinais de hipertensão portal, como a presença de colaterais, com maior sensibilidade que o ultra-som (LAMBERTUCCI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; TEIXEIRA, 2007). No entanto, até o presente momento a realização de RM exige recursos ainda indisponíveis para o uso em larga escala no nosso meio, e a realização em massa de biópsia hepática nos estudos de área endêmicas fere os preceitos éticos mais elementares. Somam-se a isso as dificuldades relacionadas à variabilidade e reprodutibilidade da própria biópsia (AFDHAL, 2004; CHEUNG *et al.*, 2008).

O C-IV não mostrou correlação com a gravidade da fibrose nos pacientes avaliados neste estudo. A utilidade da dosagem do C-IV em hepatopatias fibrosantes relacionadas à capilarização dos sinusóides é bem caracterizada (HALFON *et al.*, 2006; HIRAMATSU *et al.*, 1995; MURAWAKI *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; YONEDA *et al.*, 2007). Sua capacidade de detecção da fibrose em pacientes portadores de esquistossomose avançada, no entanto, é indefinida.

Shahim *et al.* (1992) compararam os níveis de C-IV entre grupos classificados de acordo com a apresentação clínica da esquistossomose mansônica e hematóbica no Egito, e encontraram níveis significativamente elevados do marcador apenas em pacientes portadores da forma hepatoesplênica ou complicações da hipertensão portal. Em portadores de esquistossomose mansônica na Tanzânia, os níveis do C-IV se correlacionaram com índices clínicos e ultra-sonográficos do envolvimento hepatoesplênico, mas com sensibilidade insuficiente para utilização do teste como ferramenta de triagem (KARDORFF *et al.*, 1999). Na China, Li *et al.* (2000) encontraram correlação entre o C-IV e a ocorrência de reinfeção após tratamento da esquistossomose japônica com praziquantel. Também na China, Guangjin *et al.* (2002) encontraram níveis mais elevados de C-IV em portadores de esquistossomose japônica que nos controles. Porém, não foi possível, com base nos níveis do C-IV, identificar aqueles pacientes com hepatite ou cirrose associada.

A utilidade do C-IV na detecção da fibrose esquistossomótica também foi avaliada anteriormente no Brasil (WYSZOMIRSKA *et al.*, 2005, 2006). Pacientes de um hospital de referência em Campinas foram selecionados e agrupados de acordo com a classificação clínica. Os níveis séricos do C-IV foram comparados entre os grupos e com um grupo controle. Os pacientes tiveram níveis mais elevados que os controles. Entre os pacientes, apenas o grupo com hepatoesplenomegalia e complicações da hipertensão portal apresentou níveis significativamente maiores. A redução dos níveis de C-IV observada após esplenectomia nos pacientes com a forma hepatoesplênica sugere, de acordo com os autores, que o baço tenha influência na expressão e deposição de C-IV no tecido hepático, pela sua atuação na ativação celular da fibrogênese. Assim como no presente trabalho, não foi encontrada correlação entre os níveis de C-IV e o grau de fibrose ao ultra-som.

É possível que a frequência de esplenectomia prévia observada nos pacientes com fibrose moderada e intensa no presente trabalho (sete entre 27 pacientes) tenha influenciado nos níveis de C-IV encontrados, impedindo a observação de uma progressão consistente dos referidos níveis de acordo com a gravidade da fibrose. Além disso, o pequeno número de pacientes classificados como 'E' e 'F' (dois 'E' e seis 'F' entre os 79 pacientes) pode ter influenciado no poder do estudo para detectar diferenças significativas para este marcador.

Fragilidades podem ser apontadas numa avaliação cuidadosa deste estudo. O estudo realizado em área endêmica oferece desafios que permeiam todas as fases, desde o planejamento. O modelo transversal facilita a obtenção de grande quantidade de dados e pode concentrar o esforço da coleta em um curto período de tempo. No entanto, o ambiente em que é executado, se por um lado aproxima o pesquisador das condições reais de desenvolvimento e diagnóstico da doença, por outro limita os recursos disponíveis durante o trabalho. O grande número de pessoas empenhadas na coleta de dados e permite distribuir as tarefas e reunir o maior número de informações. Por outro lado, exige constante vigilância da homogeneidade das técnicas empregadas.

Pode-se apontar também a composição da amostra como fator produtor de viés na seleção dos pacientes a serem estudados. Os pacientes residentes das localidades rurais foram selecionados de acordo com a avaliação clínica e convidados a participar. A coleta se deu durante o horário de trabalho em dias úteis durante uma semana na sede do município. Apesar da disponibilidade de transporte e alimentação oferecidos pela estrutura da pesquisa,

a participação pode ter-se tornado inviável para aqueles que não puderam ou não quiseram faltar ao trabalho para a coleta.

Um determinado número de pacientes foi selecionado a partir do diagnóstico de fibrose pelo ultra-som. Dessa forma, dados relacionados ao exame em teste que sejam influenciados pela prevalência local da doença não podem ser extraídos da amostra estudada.

Outra questão a ser levantada é a da reprodutibilidade do US. Classicamente este é um método impregnado de grande variabilidade intra e inter-examinador. Neste trabalho não foi realizada a análise da reprodutibilidade do US através da comparação com a avaliação por outro examinador, o que pode minimizar o poder de extrapolação deste estudo.

A comparação dos níveis dos marcadores bioquímicos de fibrose dos pacientes procedentes de áreas endêmicas com os métodos histológicos em casos selecionados poderia lançar luz sobre o real significado da dosagem destes marcadores no diagnóstico da fibrose hepática da esquistossomose. A comparação com as imagens de RM permitiria avaliar sua correlação com a presença de hipertensão portal, sugerida pelo achado da presença de circulação colateral como fator independente na predição da elevação da concentração do AH neste trabalho.

De acordo com os resultados do presente trabalho, acreditamos que a dosagem do ácido hialurônico no soro poderá ser útil na seleção de pacientes em áreas endêmicas suspeitos de apresentarem fibrose hepática, para serem depois examinados pelo ultra-som. Isto permitiria examinar um grande número de pessoas e limitar o número de exames ultra-sonográficos. A otimização do uso dos aparelhos de ultra-som e, principalmente, da disponibilidade das pessoas capacitadas para a realização do ultra-som já é um ganho considerável. Um projeto de estudo já elaborado visa confirmar o papel dos marcadores não invasivos como exame de triagem no diagnóstico da fibrose hepática na esquistossomose. O objetivo é a dosagem dos marcadores para posterior comparação com os achados ultra-sonográficos que serão obtidos no próximo inquérito nacional de prevalência e morbidade pela esquistossomose. Acreditamos que o crescente conhecimento dos mecanismos patogênicos celulares e moleculares da fibrose hepática, juntamente com o refinamento das técnicas empregadas, culminará em resultados inovadores. É natural a expectativa de novas oportunidades diagnósticas através da aplicação dessas técnicas às doenças negligenciadas, que, ao contrário, interessam a pacientes, clínicos e pesquisadores.

7. CONCLUSÕES

- A concentração do ácido hialurônico apresenta correlação significativa com a intensidade da fibrose diagnosticada pelo ultra-som ($p = 0,000$).
- O ácido hialurônico apresenta alta sensibilidade para o diagnóstico da fibrose esquistossomótica, em comparação com o ultra-som.
- As variáveis que se correlacionaram com o ácido hialurônico nesta amostra são a idade, a presença de fibrose periportal e a presença de circulação colateral.
- O ácido hialurônico neste estudo mostrou-se uma ferramenta valiosa como teste de triagem na avaliação da fibrose hepática.
- A concentração do colágeno IV não apresentou correlação com a intensidade da fibrose diagnosticada pelo ultra-som.

8. PROPOSIÇÕES

- Comparar a acurácia, custo e facilidade de execução do AH com outros marcadores não invasivos de fibrose.
- Testar os marcadores de fibrose em áreas endêmicas com diferentes prevalências para determinar seus valores preditivos.
- Avaliar os marcadores em comparação com o exame histológico para determinar sua correlação com o diagnóstico de certeza da fibrose esquistossomótica.
- Dosar marcadores de hipertensão portal e verificar se existe correlação com o diagnóstico clínico e ultra-sonográfico de hipertensão portal e com as dosagens do AH.
- Realizar análise dos custos de execução do AH em larga escala e comparar com o US para verificar a viabilidade de sua adoção como teste de triagem no planejamento de saúde.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Filadélfia: Saunders Elsevier. 2007. 566p.

ABDEL-AZIZ, G. *et al.* Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 137, n. 6, p. 1333-1342, 1990.

ABDEL-WAHAB, M.F. *et al.* (Eds). The use of ultrasonography in diagnosis of different schistosomal-syndromes. Proceedings of the Third International Workshop on Diagnostic Ultrasound Imaging (Cairo, Egypt): Al-Ahram Press, 1978. p.458-463.

ABDEL-WAHAB, M.F. *et al.* Characteristic sonographic patterns of schistosomal hepatic fibrosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 72-76, 1989.

ABDEL-WAHAB, M.F. *et al.* Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 46, n. 4, p.403-408, 1992.

ABDEL-WAHAB, M.F.; STRICKLAND, G.T. Abdominal ultrasonography for assessing morbidity from schistosomiasis 2. Hospital studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 87, n. 2, p. 135-137, 1993.

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

AFDHAL, N. H. Biopsy or biomarkers: is there a gold standard for diagnosis of liver fibrosis? *Clin. Chem.*, Baltimore, v. 50, n. 8, p. 1299-1300, 2004.

ALARCÓN de NOYA, B. *et al.* *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.95, p.106-112, 2000.

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

ANDRADE Z. A.; BINA J. C. The pathology of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni in its advanced form (study of 232 complete necropsies). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 285-305, Jul.-Sep.1983

ANDRADE Z. A.; PEIXOTO, E. Pathology of periportal fibrosis involution in human schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 263-272, 1992.

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

ANDRADE, Z. A. *et al.* Hepatic connective tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis. *Hum. Pathol.*, Filadélfia, v.23, p. 566-573, 1992.

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

- ANDRADE, Z.; GRIMAUD, J. A. Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 124, p. 59-65, 1986.
- ARUFFO, A. *et al.* CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, Cambridge, v. 61, n. 7, p. 1303-1313, Jun. 1990.
- AYCOCK, R. S.; SEYER, J. M. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect. Tissue Res.*, Filadélfia, v. 23, p. 19-31, 1989.
- BARATA, C. H.; PINTO-SILVA, R. A.; LAMBERTUCCI, J. R. Abdominal ultrasound in acute schistosomiasis mansoni. *Br. J. Radiol.*, Londres, v.72, p. 949-952, 1999.
- BARKUN, A.N. *et al.* The bedside assessment of splenic enlargement. *Am. J. Med.*, Nova York, v. 91, p. 512-518, 1991.
- BAVIA, M. E. *et al.* Use of thermal and vegetation index data from earth observing satellites to evaluate the risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 79, p. 79-85, 2001.
- BENEDETTI, A., MARUCCI, L. The significance of apoptosis in the liver. *Liver*, Copenhagen, v. 19, p. 453-463, 1999.
- BLAZEJEWSKI, S. *et al.* Human myofibroblast-like cells obtained by outgrowth are representative of the fibrogenic cells in the liver. *Hepatology*, Baltimore, v. 22, p. 788-798, 1995.
- BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepato-splenic schistosomiasis mansoni. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 51, p. 1-14, 1957.
- BROWNER, W. S. *et al.* Preparando-se para estimar o tamanho de amostra: hipóteses e princípios básicos. In: HULLEY, S. B. *et al.* Delineando a pesquisa clínica: Uma abordagem epidemiológica. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed. 2006. Capítulo 5, p. 69-82. Capítulo 6, p. 83-110
- BURCHARD, G. D. *et al.* Schistosoma mansoni infection in a recently exposed community in Senegal: lack of correlation between liver morphology in ultrasound and connective tissue metabolites in serum. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v. 3, n. 3, p. 234-241, 1998.
- CAIRO WORKING GROUP 1992. The use of diagnostic ultra-sound in schistosomiasis – attempts at standardization of methodology. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 51, p. 45-63, 1992.
- CASTERA, L.; XAVIER, F.; ALFREDO, A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J. Hepatology*, Amsterdã, v. 48, p. 835-847, 2008.
- CAVALCANTI, A.; BARBOSA Jr, A. A.; ANDRADE Z. A. Contribution to the study of collagen degradation. *J. Bras. Pathol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 329-336, 2002.
- CHEEVER, A. W. Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 689-692, 1997

- CHENSUE, S. *et al.* Production of superoxid anion, prostaglandins, and hydroxyeicosatetraenoic acid by macrophages from hypersensitivity-type (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign body-type granulomas. *Infect. Immun.*, Washington, v. 42, n. 3, p. 1116-1125, 1983.
- CHEUNG, K. J. *et al.* Proteomics in liver fibrosis is more than meets the eye. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, Londres, v. 20, p. 450-464, 2008.
- COTA, G.F. *et al.* Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 74, n. 1, p. 103-107, 2006.
- COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 99, p.13-19, 2004. Suplemento 1.
- DEBERNARDI-VENON, W. *et al.* AT1 receptor antagonist candesartan in selected cirrhotic patients: effect on portal pressure and liver fibrosis markers. *J. Hepatol.*, Amsterdã, v. 46, n. 6, p. 1026-1033. Epub Feb. 2007.
- DELPECH, B.; BERTRAND, P.; MAINGONNAT, C. Immunoenzymoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. *Anal. Biochem.*, Nova York, v. 149, n. 2, p. 555-65, 1985.
- DOEHRINGER-SCHWERTDFEGER, E. *et al.* Sonomorfolological abnormalities in Sudanese children with *Schistosoma mansoni* infection: a proposed staging-system for field diagnosis of periportal fibrosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 41, n. 1, p. 63-69, 1989.
- DRUMMOND, S. C. *et al.* Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 101, p. 37-44, 2006. Suplemento 1
- EBOUMBOU, C. *et al.* Circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis in Sudanese subjects at risk of schistosomiasis and hepatitis. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 94, p. 99-106, 2005.
- EL-BADRAWY, N. M. *et al.* Effect of praziquantel on the distribution of interstitial collagen types I and III and basement membrane collagen types IV and V in murine hepatic schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres v. 85, p. 752-755, 1991.
- EL-SOKKARY, G. H. *et al.* Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free Radic. Biol. Med.*, Tarrytown, v. 32, n. 4, p. 319-332, 2002.
- ELTOUM, I. A. *et al.* Predictors of upper gastrointestinal bleeding in patients with schistosomal periportal fibrosis. *Br. J. Surg.*, Chichester, v. 81, n. 7, p. 996-999, 1994.
- ENGSTRÖM-LAURENT, A. *et al.* Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology*, Baltimore, v. 5, n. 4, p. 638-642, 1985.

- FACUNDO, H. T. F. *et al.* Elevated levels of erythrocyte-conjugated dienes indicate increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 37, p. 957-962, 2004.
- FATAAR, S. *et al.* CT of hepatic schistosomiasis mansoni. *Am. J. Roentgenol.*, Springfield, v. 145, p. 63-66, 1985.
- FRASER, J. R. E. *et al.* Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, Oxford, v. 11, p. 17-25, 1984.
- FRASER, J. R. E. *et al.* Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Int. Med.*, Oxford, v. 242, p. 27-33, 1997.
- FRASER, J. R. *et al.* Removal of hyaluronic acid from the circulation in rheumatoid disease and primary biliary cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.*, Nova York, v. 107, n. 1, p. 79-85, 1986.
- FRÉBOURG, T. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzymeimmunological assay. *Hepatology*, Baltimore, v. 6, n. 3, p. 392-395, 1986.
- FREITAS, C. R. L. *et al.* Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 6, p. 815-822, 1999.
- FRIEDMAN S. L. Cytokines and fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, Nova York, v. 19, n. 2, p. 129-140, 1999.
- FRIEDMAN S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.
- FRIEDMAN S. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital*, Boston: The cellular basis of hepatic fibrosis - mechanisms and treatment strategies. *N. Eng. J. Med.*, Boston, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, 1993.
- FRIEDMAN, S. L. *et al.* Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *PNAS USA*, Washington, v. 85, p. 8681-8685, 1985.
- FURUSYO, N. *et al.* Liver damage in hemodialysis patients with hepatitis C virus viremia: a prospective 10-year study. *Dig. Dis. Sci.*, Nova York, v. 45, n. 11, p. 2221-2228, 2000.
- GALAMBOS, J. T. *et al.* The rate of synthesis of glycosaminoglycans and collagen by fibroblasts cultured from adult human liver biopsies. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 60, p.107-114,1977.
- GALAMBOS, J. T.; SHAPIRA, R. Natural history of alcoholic hepatitis. IV. Glicosaminoglycurans and collagen in the hepatic connective tissue. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 52, p. 2952-2962, 1973.
- GALLORINI, A. *et al.* Serum markers of hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis type C treated with alfa-2A interferon. *Liver*, Copenhagen, v. 14, n. 5, p. 257-264, 1994.

- GARBISA, S. *et al.* Assay for radiolabeled type IV collagen in the presence of other proteins using a specific collagenase. *Anal. Biochem.*, Nova York, v. 107, n. 1, p. 187-192, 1980.
- GARCIA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 22, p. S38-S42, 2007. Suplemento 1.
- GERDIN, B.; HÄLLGREN, R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J. Int. Med.*, Oxford, v. 242, p. 49-55, 1997.
- GEREMIAS, A. *et al.* TGF β I and PDGF AA override collagen type I inhibition of proliferation in human liver connective tissue cells. *BMC Gastroenterol.*, Londres, v. 4, p. 30, 2004.
- GESPARCER-LARA, R. *et al.* Splenic palpation for the evaluation of morbidity due to schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, p. 245-248, 1998. Suplemento.
- GESPARCER-LARA, R. *et al.* Ultrasonography of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 91, p. 307-309, 1997.
- GRESSNER, A. M. The cell biology of liver fibrosis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell. Tissue Res.*, Berlin, v. 292, p. 447-452, 1998.
- GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, Nova York, v. 10, n. 1, p. 30-46, 1990.
- GRESSNER, A. M.; HAARMANN, R. Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Diego, v. 151, n. 1, p. 222-229, 1988.
- GRESSNER, A. M.; PAZEN, H.; GREILING, H. The synthesis of total and specific glycosaminoglycans during development of experimental liver cirrhosis. *Experientia*, Basel, v. 33, n. 10, p.1290-1292,1977.
- GRESSNER, O. V.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdã, v. 381, p. 107-113, 2007. a
- GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp. Hepatol.*, Londres, v. 6, p. 7, 2007. b
- GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J. Gastrointestin. Liver Dis.*, Cluj-Napoca, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.
- GRIMAUD, J. A. *et al.* Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 335-344, 1987.

GRIMAUD, J. A. Cell-matrix interactions in schistosomal portal fibrosis: a dynamic event. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82, p. 55-65, 1987. Suplemento IV.

GRIMAUD, J. A. *et al.* Collagen immunotyping in human liver: light and electron microscope study. J. Histochem. Cytochem., Nova York, v. 28, n. 11, p. 1145-1156, 1980.

GRIMAUD, J-A.; BOROJEVIC, R. Chronic human schistosomiasis mansoni. Pathology of the Disse's space. Lab. Invest., Nova York, v. 36, n. 3, p. 268-273, 1977.

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

GUANGJIN, S. *et al.* Study on histopathology, ultrasonography and some special serum enzymes and collagens for 38 advanced patients of schistosomiasis japonica. Acta Trop., Basíliá, v. 82, p. 235-246, 2002.

GUÉCHOT, J. *et al.* Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. Clin. Chem., Baltimore, v. 42, n. 4, p. 456-463, 1996.

GUÉCHOT, J. *et al.* Prognostic value of serum hyaluronan in patients with compensated HCV cirrhosis. J. Hepatol., Amsterdã, v. 32, p. 447-452, 2000.

GUÉCHOT, J. *et al.* Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. J. Hepatol., Amsterdã, v. 20, n. 3, p. 388-393, Mar. 1994.

GUÉCHOT, J. *et al.* Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of α -interferon therapy. J. Hepatol, Amsterdã, v. 22, p. 22-26, 1995.

GUEVARA, R. J. R. Esquistossomose na área hiperendêmica de Brejo do Espírito Santo, com seguimento de 29 anos. 2005. 239p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

GUIMARÃES, R. J. P. S *et al.* Analysis and estimative of schistosomiasis prevalence for the state of Minas Gerais, Brazil, using multiple regression with social and environmental spatial data. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, p. 91-96, 2006. Suplemento 1.

HAHN, E. *et al.* Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. Gut, Londres, v. 21, p. 63-71, 1980.

HALFON, P. *et al.* Les marqueurs sanguins non invasifs de fibrose hépatique au cours de l'infection chronique par le virus de l'hepatite C. Rev. Med. Interne, Paris, v. 27, p. 751-761, 2006.

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

HANNA, S. *et al.* Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. Parasitol. Res., Berlim, v. 96, p. 6-11, 2005.

- HASCALL, V. C.; HEINEGÅRD, D. Aggregation of cartilage proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 249, n. 13, p. 4232-4241, 1974.
- HASSAN, M. M. *et al.* Relationship between circulatory antigen level and morbidity in Schistosoma mansoni infected children evaluated by ultrasonography. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 61, n. 4, p. 635-638, 1999.
- HASSANEIN, H. I. *et al.* Effect of early treatment with praziquantel on serum connective tissue metabolite markers in children and adolescents with intestinal schistosomiasis mansoni. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 47, n. 1, p. 84-87, Jan. 1997.
- HERBST, H. *et al.* Heterogeneity of liver cells expressing procollagen types I and IV in vivo. *Histochem. Cell Biol.*, Berlin, v. 107, p. 399-409, 1997.
- HIRAMATSU, N. *et al.* Improvement of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients treated with natural interferon alpha. *J. Hepatol.*, Amsterdã, v. 22, p. 135-142, 1995.
- HOMEIDA, M. *et al.* Diagnosis of pathologically confirmed Symmers periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 38, n. 1, p.86-91, 1988.
- IBGE – FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População estimada 2007. Santa Maria da Vitória. Cidades @. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 1 ago. 2008
- ISHIBASHI, K. *et al.* Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology*, Baltimore, v. 24, n. 1, p. 27-31, 1996.
- JACOBS, W. *et al.* Adult Schistosoma mansoni worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma in vivo. Stereological analysis and immunophenotyping of extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and chemokines. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 150, n. 6, p. 2033-2045, 1997.
- JACOBS, W. *et al.* Transforming growth factor- β , basement membrane components and heparan sulphate proteoglycans in experimental hepatic schistosomiasis mansoni. *Cell. Tissue Res.*, Berlin, , v. 292, p. 101-106, 1998.
- KARDORFF, R. *et al.* Diagnostic value of connective tissue metabolites in Schistosoma mansoni related liver disease. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 73, p. 156-164, 1999.
- KARIUKI, H.C. *et al.* Prevalence and familial aggregation of schistosome liver morbidity in Kenya: evaluation by new ultrasound criteria. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.183, n.6, p. 960, 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*, São Paulo, v.14, p. 397-400, 1972.
- KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 22, p. S73-S78, 2007. Suplemento 1.

- KNITTEL, T. *et al.* Differential expression of collagen types I, III and IV by fat-storing (Ito) cells in vitro. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 102, p. 1724-1735, 1992.
- KÖPKE-AGUIAR, L. A. *et al.* Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis. *Acta Trop.*, Basilléia, v. 84, n. 2, p.117-126, 2002.
- KUBO, S. *et al.* Correlation between preoperative serum concentration of type IV collagen 7s domain and hepatic failure following resection of hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.*, Filadélfia, v. 239, p. 186-193, 2004.
- KUBO, S. *et al.* Appropriate surgical management of small hepatocellular carcinomas in patients infected with hepatitis C virus. *World J Surg.*, Nova York, v. 27, p. 437-442, 2003.
- LAMBERTUCCI, J. R.; ANDRADE, L. M.; PINTO-SILVA, R. A. Magnetic resonance imaging of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 679-80, Nov-Dez. 2002
- LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Acute schistosomiasis: report on five singular cases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 631-635, 1997.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 147-150, 2001. Suplemento 1. a
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 333-7, Aug. 2004.
- LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* O projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p.127-135, 1996.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Piogenic abscesses and parasitic diseases. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 67-74, 2001. b
- LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop.*, Basel, v.77, p.101-109, 2000.
- LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Haluronan. *FASEB J.*, Bethesda, v. 6, p. 2397-2404, 1992.
- LEBENSZTEJN, D. M. *et al.* Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 12, n. 21, p. 3338-3343, 2006.
- LEEUW, A. M. *et al.* Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology*, Baltimore, v. 4, n. 3, p. 392-403, 1984.
- LENZI, H. L. *et al.* Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 32, p. 639-643, 1999.

- LENZI, H. L. *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, p. 141-151, 1998. Suplemento 1.
- LEROY, V. *et al.* Changes in histological lesions and serum fibrogenesis markers in chronic hepatitis C patients non-responders to interferon alpha. J. Hepatol., Amsterdã, v. 35, n. 1, p. 120-126, 2001.
- LEROY, V. *et al.* Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. Am. J. Gastroenterol., Malden, v. 99, n. 2, p. 271-279, 2004.
- LI, Y. S. *et al.* Two-year impact of praziquantel treatment for *Schistosoma japonicum* infection in China, subclinical disease and fibrosis marker measurements. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., Londres, v. 94, p. 191-197, 2000.
- LICHTENBERG, F. Lessons of the intrahepatic portal radicles in Manson's schistosomiasis. Am. J. Pathol., Bethesda, v. 31, p. 757-771, 1955.
- LUTZ, A. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações, feitas no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.11, p.121-150, 1919.
- MAHER, J. J.; MCGUIRE, R. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. J. Clin. Invest., Ann Arbor, v. 86, p. 1641-1648, 1990.
- MAILLARD, M. E.; SORREL M. F. Hepatopatia alcoólica. In: FAUCI; BRAUNWALD; KASPER; HAUSER; LONGO; JAMESON; LOCALZO (Eds.). Harrison Medicina Interna. 17ª edição. Rio de Janeiro: McGrall Hill. 2009. Volume II/II, Capítulo 309, p.1969-1971.
- MANZELLA, A. *et al.* Schistosomiasis of the liver. Abdom. Imaging, Nova York, v. 33, p. 144-150, 2007.
- MARINHO, C. C. *et al.* Clinical versus ultrasound examination in the evaluation of hepatosplenic schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.101, p. 317-321, Sep. 2006. Suplemento 1.
- MARTINS, J. R. M. *et al.* Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. Anal. Biochem., Nova York, v. 319, p. 65-72, 2003.
- MATSUZAKI, Y. *et al.* Enzyme immunoassay of serum type IV collagen in anti-HCV positive chronic liver diseases. Clin. Chim. Acta, Amsterdã, v. 221, p. 209-217, 1993.
- McHUTCHISON, J. G. *et al.* Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. J. Gastroenterol. Hepatol., Melbourne, v. 15, p. 945-951, 2000.
- MEYER, D. *et al.* The synthesis of glycosaminoglycans in isolated hepatocytes during experimental liver fibrogenesis. Liver, Copenhagen, v. 10, p. 94-105, 1990.

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

MURAWAKI, Y. *et al.* Comparison of serum 7S fragment of type IV collagen and serum central triple-helix of type IV collagen for assessment of liver fibrosis in patients with chronic viral liver disease. *J. Hepatol.*, Amsterdã, v. 24, p. 148-154, 1996. a

MURAWAKI, Y. *et al.* Diagnosis value of serum type IV collagen test in comparison with platelet count for predicting the fibrotic stage in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 16, p. 777-781, 2001.

MURAWAKI, Y. *et al.* Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 11, n. 5, p. 459-4, May, 1996. b

MURAWAKI, Y. *et al.* Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C: a comparative analysis. *J. Hepatol.*, Amsterdã, v. 23, p. 145-152, 1995.

MURAWAKI, Y. *et al.* Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: relationship to liver histology. *Hepatology*, Baltimore, v. 20, p. 780-787, 1994.

NAKAMUTA, M. *et al.* Effects of fibril- or fixed-collagen on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 production in the human hepatocyte cell line HLE. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 11, n. 15, p. 2264-2268, 2005.

NAKATSUCASA, H. *et al.* Cellular distribution of transforming growth factor- β 1 and procollagen types I, III and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 85, p. 1833-1843, 1990.

NIAMEY WORKING GROUP. Ultrasound in schistosomiasis. A practical guide to standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity. Second International Workshop October 22-26, 1996, Niamey, Niger. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000. TDR/STR/SCH/00.1.

NIEMELÄ, O. *et al.* Type IV collagen and laminin-related antigens in human serum in alcoholic liver disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, Berlim, v. 15, p. 132-137, 1985.

NYBERG, A. *et al.* Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen in primary biliary cirrhosis: relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome. *J. Intern. Med.*, Oxford, v. 231, n. 5, p. 485-491, May. 1992.

NYBERG, A. *et al.* Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis – a biochemical marker for progressive liver damage. *Hepatology*, Baltimore, v. 8, n. 1, p. 142-146, Jan-Feb. 1988.

OBATA, K. *et al.* One step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdã, v. 181, p. 293-304, 1989.

- OBERTI, F. *et al.* Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 113, p. 1609-1616, 1997.
- PARÉS, A. *et al.* Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology*, Baltimore, v. 24, n. 6, p. 1399-403, 1996.
- PARISE, E. R. *et al.* Basement membrane proteins and type III procollagen in murine schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 79, p. 663-670, 1985.
- PASCAL, M. *et al.* Hyaluronate levels and markers of oxidative stress in the serum of Sudanese subjects at risk of infection with *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 94, n. 1, p. 66-70, 2000.
- PATEL, K. *et al.* Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 18, n. 3, p. 253-257, 2003.
- PEARCE, E. J. *et al.* Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v. 201, p. 117-126, 2004.
- PEREIRA, T. N. *et al.* Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. *J Hepatol.*, Amsterdam, v. 41, p. 576-583, 2004.
- PINTO-SILVA, R.A. *et al.* Sonographic features of portal hypertension in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 355-361, 1994.
- PLEBANI, M.; BURLINA, A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin. Biochem.*, Toronto, v. 24, p. 219-239, 1991.
- PRATA A. The role of the scientific research in the control of schistosomiasis in endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, p. 5-11, 2004. Suplemento 1.
- PRATA, A.; ANDRADE, Z. Fibrose hepática de Symmers sem esplenomegalia. *O Hospital*, Rio de Janeiro, v.63, n.3, p.617-623, 1963.
- QI, Z. *et al.* Blockade of type β transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *PNAS USA*, Washington, v. 96, p. 2345-2349, 1999.
- RAJNISH, J. *et al.* Accuracy and reliability of palpation and percussion for detecting hepatomegaly: a rural hospital-based study. *Indian J. Gastroenterol.*, Bombaim, v. 23, p. 171-174, 2004.
- RICARD-BLUM, S. *et al.* Relationships between several markers of extracellular matrix turnover and ultrasonography in human schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 60, n. 4, p. 658-663, 1999.
- RICHTER, J. *et al.* Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 77, p. 111-131, 2000.
- RICHTER, J. *et al.* Hepatosplenic schistosomiasis; comparison of sonographic findings in Brazilian and Sudanese patients – correlation of sonographic findings with clinical symptoms. *Radiology*, Easton, v. 184, p. 711-716, 1992. a

- RICHTER, J. *et al.* Report on the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-156, 2001. Suplemento.
- RICHTER, J. *et al.* Sonographic organometry in Brazilian and Sudanese patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and its relation to the risk of bleeding from oesophageal varices. Acta Trop., Basileia, v.51, n. 3-4, p. 281-290, 1992. b
- RICHTER, J. *et al.* Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. Trop. Med. Int. Health, Oxford, v. 3, n. 9, p. 728-735, 1998. c
- RISTELI, J.; RHODE, H.; TIMPL, R. Sensitive radioimmunoassays for 7-S collagen and laminin: application to serum and tissue studies of basement membranes. Anal. Biochem., Nova York, v. 113, p. 372-378, 1981.
- ROCKEY, D. C. Vascular mediators in the injured liver. Hepatology, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 4-12, 2003.
- SAKUGAWA, H. *et al.* Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. World J. Gastroenterol., Beijing, v. 11, n. 2, p. 255-259, 2005.
- SANDRIN, L. *et al.* Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. Ultrasound Med. Biol., Nova York, v. 29, n. 12, p. 1705-1713, 2003.
- SANTOS, V. N. *et al.* Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. Braz. J. Med. Biol. Res., São Paulo, v. 38, p. 747-753, 2005.
- SATO, N. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. J. Gastroenterol. Hepatol., Melbourne, v. 22, p. S1-S6, 2007. Suplemento 1.
- SATOH, T. *et al.* Interaction between hyaluronan and CD44 in the development of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. J. Gastroenterol. Hepatol., Melbourne, v. 15, p. 402-411, 2000.
- SAVOLAINEN, E. R. *et al.* Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts. Gastroenterology, Filadélfia, v. 87, p. 777-787, 1984.
- SAVOLAINEN, E. R. *et al.* Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. Biochem. J., Londres, v. 249, p. 753-757, 1988.
- SCHUPPAN, D. *et al.* Radioimmunoassay for the carboxy-terminal cross-linking domain of type IV (basement membrane) procollagen in body fluids. Characterization and application to collagen type IV metabolism in fibrotic liver disease. J. Clin. Invest., Ann Arbor, v. 78, p. 241-248, 1986.

- SHAHIN, M. *et al.* Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology*, Bethesda, v. 15, p. 637-644, 1992.
- SHIMAHARA, Y. *et al.* Significance of serum type IV collagen level of hepatectomized patients with chronic liver damage. *World J. Surg.*, Nova York, v. 26, p. 451-456, 2002.
- SILVA, L. C. Comparação entre a ultra-sonografia e a ressonância magnética do abdome na avaliação da morbidade na esquistossomose mansônica. 2007. 95f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) - Programa de Pós-Graduação da Faculdade de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, L. C. *et al.* Disagreement between ultrasound and magnetic resonance imaging in the identification of schistosomal periportal fibrosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, p. 279-282, 2006. Suplemento 1.
- SILVA, L. M. *et al.* Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 98, p. 34-42, 2006.
- SINGH, K. P. *et al.* Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 98, n. 6, p. 581-593, 2004.
- SMEDSRØD, B. Non-invasive means to study the functional status of sinusoidal liver endothelial cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 95, n. 10, p. S81-S83, 1995.
- SOUSA-PEREIRA, S. R. *et al.* Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 28, p. 473-478, 2006.
- SOUZA, A.L.S. *et al.* The role of chemokines in *Schistosoma mansoni* infection: insights from human disease and murine models. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, p. 333-338, 2006. Suplemento 1.
- SOUZA, C. Exame do abdome. *In*: LÓPEZ, M.; LAURENTIS-MEDEIROS, J. *Semiologia Médica: As bases do diagnóstico clínico*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Revinter. 2004. Capítulo 47, p.722-735.
- SPENCER, L. *et al.* Comparative analysis between the circumoval precipitin test and *ELISA* with raw antigens for the diagnosis of schistosomiasis in Venezuela. *G E N*, Caracas, v.45, n.2, p.77-83, Apr-Jun 1991.
- STICKEL, F. *et al.* Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig. Dis. Sci.*, Londres, v. 46, n. 9, p. 2025-2032, 2001.
- STICKEL, F. *et al.* Serum hyaluronate correlates with histological progression in alcoholic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, Londres, v. 15, n. 9, p. 945-950, 2003.
- STONE P. J. Potential use of collagen and elastin degradation markers for monitoring liver fibrosis in schistosomiasis. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 77, p. 97-99, 2000.

- SULLIVAN, S.; WILLIAMS, R. Reliability of clinical techniques for detecting splenic enlargement. *Br. Med. J.*, Londres, v. 2, p.1043-1044, 1976.
- SUOU, T. *et al.* Relationship between serum and hepatic 7S fragments of type IV collagen in chronic liver disease. *Hepatology*, Baltimore, v. 12, p. 1154-1158, 1996.
- SUZUKI, A. *et al.* Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.*, Oxford, v. 25, p. 779-786, 2005.
- SYMMERS, W. S. C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. *J. Pathol. Bacteriol.*, Londres, v. 9, p. 237-239, 1904.
- TAMAKI, S. *et al.* Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 111, p. 1049-1057, 1996.
- TANG, J. T. *et al.* T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 12, n. 19, p. 3015-3019, 2006.
- TAO, J. *et al.* Influence factors of serum fibrosis markers in liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 9, n. 11, p. 2497-2500, 2003.
- TEIXEIRA, I. V. S. Comparação entre a fibrose periportal diagnosticada pelo ultra-som e pela ressonância magnética e a histologia hepática na hipertensão portal esquistossomótica. 2007. 94F. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) - Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TIMPL, R. *et al.* A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.*, Berlim, v. 120, p. 203-211, 1981.
- TOLEDO, C. F. *et al.* Endothelial markers in schistosomiasis patients with or without portal hypertension. *Dig. Dis. Sci.*, Londres, Aug 27, 2008. [Epub ahead of print]
- TORRE, F. *et al.* Peripheral blood serum markers for apoptosis and liver fibrosis: are they trustworthy indications of liver realness? *Dig. Liver Dis.*, Amsterdã, v. 40, n. 6, p. 441-445, Jun. 2008
- TSUTSUMI, M. *et al.* Changes in type IV collagen content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*, Baltimore, v. 17, p. 820-827, 1993.
- UENO, T. *et al.* Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 105, p. 475-481, 1993.
- WANG, T. *et al.* Correlation of serum markers with fibrosis staging in chronic viral hepatitis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, Beijing, v. 27, n. 3, p.185-190, Jun. 1998.
- WEI, H. S. *et al.* Effects of ATI receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl4. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 26, n. 4, p. 540-545, 2000.

- WIESLANDER, J.; HEINEGÅRD, D. Immunochemical analysis of cartilage proteoglycans. *Biochem. J.*, Londres, v. 187, p. 687-694, 1980.
- WILLEMSSEN, U.F. *et al.* MRI of hepatic schistosomiasis mansoni. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, Nova York, v. 19, n. 5, p. 811-813, 1995.
- WYNN, T.A. *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v. 201, p. 156-167, 2004.
- WYSZOMIRSKA, R. M. A. F. *et al.* Decrease of type IV collagen and TIMP-1 serum levels after splenectomy in patients with schistosomiasis mansoni. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 97, p. 301-308, 2006.
- WYSZOMIRSKA, R. M. A. F. *et al.* High serum laminin and type IV collagen levels in schistosomiasis mansoni. *Arq. Gastroenterol.*, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 221-225, 2005.
- YABU, K. *et al.* Serum collagen type IV for the assessment of fibrosis and resistance to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Scan. J. Gastroenterol.*, Oslo, v. 29, p. 474-479, 1994.
- YAMADA, M. *et al.* Serum hyaluronic acid reflects the effect of interferon treatment on hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 11, n. 7, p. 646-651, Jul. 1996.
- YONEDA, M. *et al.* Type IV collagen 7s domain is an independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. *J. Gastroenterol.*, Tóquio, v. 42, p. 375-381, 2007.
- ZHENG, M. *et al.* ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 8, n. 6, p.1073-1076, 2002.
- ZHENG, M. *et al.* Determination of serum levels of YKL-40 and hyaluronic acid in patients with hepatic fibrosis due to schistosomiasis japonica and appraisal of their clinical value. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 96, p. 148-152, 2005.
- ZHOU, X. H.; OBUCHOWSKI, N. A.; McCLISH, D.K. Measures of diagnostic accuracy. *In: ZHOU, X. H.; OBUCHOWSKI, N. A., McCLISH, D.K. Statistical methods in diagnostic medicine.* Nova York: Wiley. 2002. Capítulo 2, p. 15-56
- ZWINGENBERGER, K. *et al.* Liver involvement in human schistosomiasis mansoni. Assessment by immunological and biochemical markers. *Parasitol. Res.*, Berlim, v. 74, p. 448-455, 1988. a.
- ZWINGENBERGER, K. *et al.* Liver involvement in human schistosomiasis mansoni. Regression of immunological and biochemical disease markers after specific treatment. *Acta Trop.*, Basiléia, v. 45, n. 3, p. 263-275, Sep. 1988. b

APÊNDICE

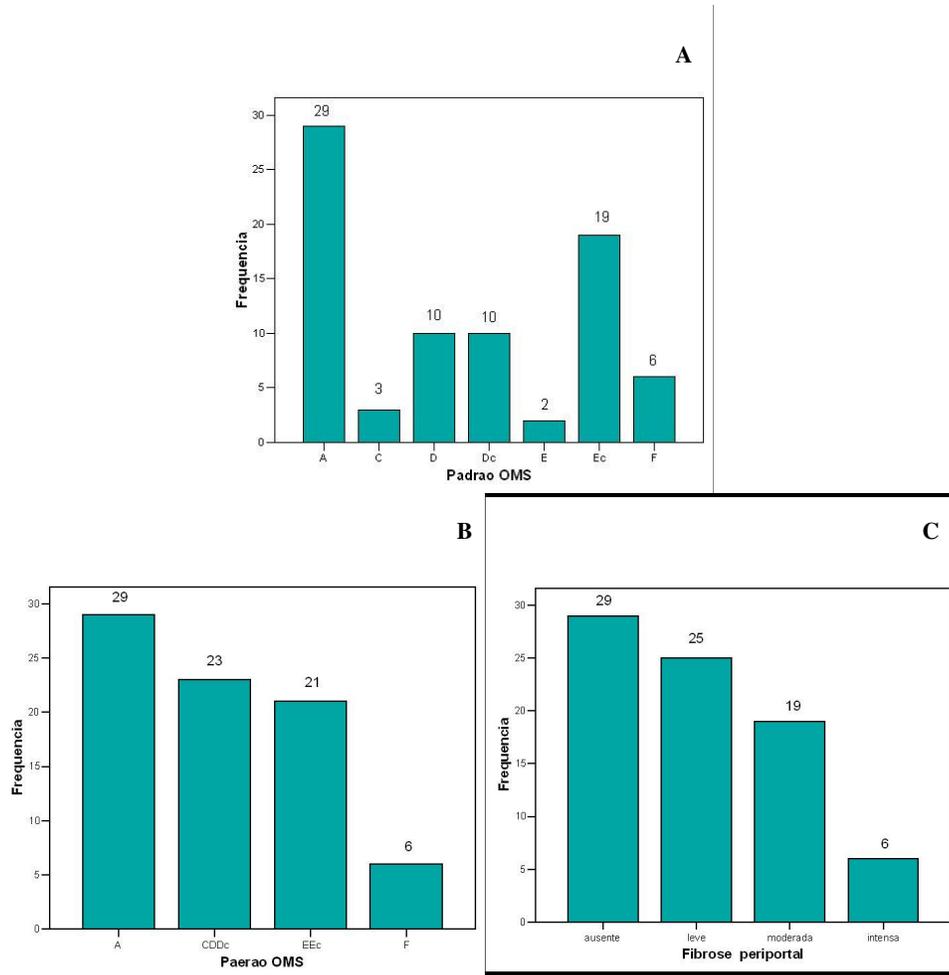


GRÁFICO 4. Diagnóstico de fibrose à ultra-sonografia. A. Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). B. Distribuição dos pacientes divididos em quatro grupos de acordo com a classificação da OMS. C. Distribuição dos pacientes de acordo com a avaliação subjetiva da fibrose

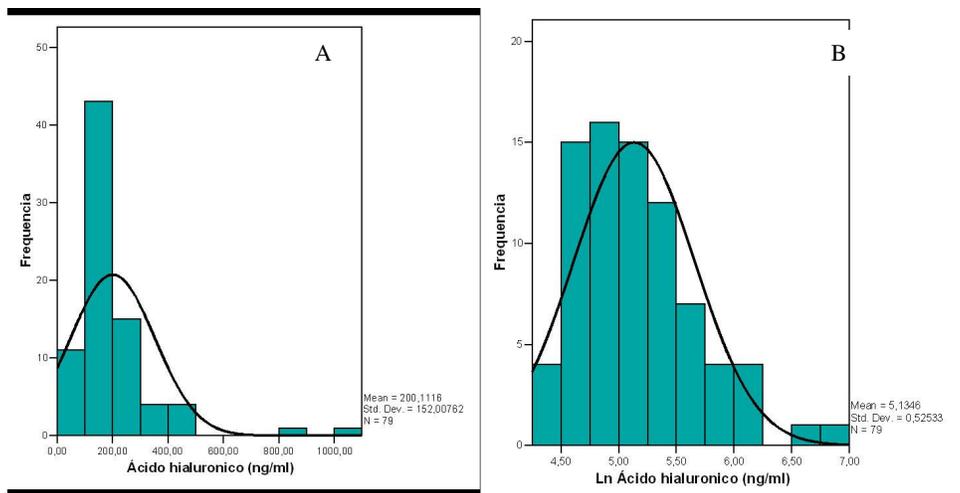


GRÁFICO 5. A. Distribuição da variável ácido hialurônico.
B. Distribuição da variável ácido hialurônico após transformação logarítmica

TABELA 9 – Coordenadas da curva ROC para o ácido hialurônico no diagnóstico da fibrose pelo padrão da Organização Mundial de Saúde

Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1 - Especificidade
3,2839	1,000	1,000
4,3362	1,000	,964
4,4132	1,000	,929
4,4454	1,000	,893
4,4804	1,000	,857
4,5112	1,000	,821
4,5163	1,000	,786
4,5362	,980	,786
4,5602	,980	,750
4,5726	,980	,714
4,5910	,980	,679
4,6084	,980	,643
4,6287	,980	,607
4,6505	,980	,571
4,6645	,980	,536
4,6724	,980	,500
4,6976	,980	,464
4,7257	,980	,429
4,7318	,980	,393
4,7483	,980	,357
4,7658	,961	,357
4,7793	,941	,357
4,7953	,941	,321
4,8055	,922	,321
4,8118	,902	,321

TABELA 9 – continuação

4,8145	,882	,321
4,8210	,863	,321
4,8286	,863	,286
4,8334	,863	,250
4,8423	,863	,214
4,8557	,843	,214
4,8673	,824	,214
4,8942	,824	,179
4,9227	,804	,179
4,9465	,784	,179
4,9832	,765	,179
5,0031	,745	,179
5,0139	,725	,179
5,0247	,706	,179
5,0270	,686	,179
5,0424	,686	,143
5,0582	,667	,143
5,0751	,667	,107
5,0925	,647	,107
5,0999	,627	,107
5,1236	,608	,107
5,1430	,588	,107
5,1835	,588	,071
5,2283	,569	,071
5,2378	,549	,071
5,2511	,549	,036
5,2631	,529	,036
5,2742	,510	,036
5,2868	,490	,036
5,3008	,471	,036
5,3113	,451	,036
5,3290	,431	,036
5,3727	,412	,036
5,4100	,392	,036
5,4296	,373	,036
5,4399	,353	,036
5,4700	,333	,036
5,5242	,333	,000
5,5512	,314	,000
5,5541	,294	,000
5,5592	,275	,000
5,6007	,255	,000
5,6437	,235	,000
5,6648	,216	,000
5,7257	,196	,000
5,7725	,176	,000
5,8564	,157	,000
5,9439	,137	,000
6,0030	,118	,000

TABELA 9 – continuação

6,0602	,098	,000
6,0671	,078	,000
6,0855	,059	,000
6,4015	,039	,000
6,8391	,020	,000
7,9760	,000	,000

TABELA 10 – Comparação das medianas da concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação subjetiva da fibrose, usando o teste ANOVA

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	p
Entre grupos	12,954	3	4,318	37,783	0,000
Dentro dos grupos	8,572	75	0,114	-	-
Total	21,526	78	-	-	-
A x CDDc**	-	-	-	-	0,000
A x EEc**	-	-	-	-	0,000
A x F**	-	-	-	-	0,006
CDDc x EEc**	-	-	-	-	0,252
CDDc x F**	-	-	-	-	0,032
EEc x F**	-	-	-	-	0,085

* grau de liberdade. ** Teste não paramétrico para homogeneidade das variâncias ($p = 0,005$)

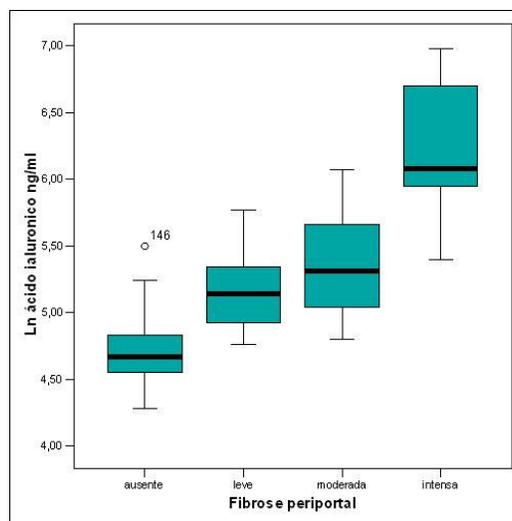


GRÁFICO 6 - Concentração do ácido hialurônico de acordo com a classificação subjetiva da fibrose pelo ultra-som

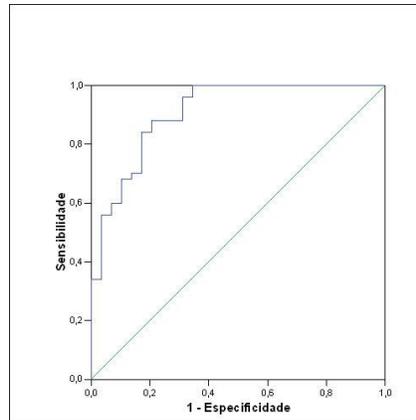


GRÁFICO 7 - Curva ROC: ácido hialurônico
na classificação subjetiva da fibrose pelo ultra-som
AUC: 0,91 (IC 95% 0,84 - 0,98).

TABELA 11 – Coordenadas da curva ROC para o ácido hialurônico no diagnóstico
subjetivo da fibrose pelo ultra-som

Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1 - Especificidade
3,2839	1,000	1,000
4,3362	1,000	,966
4,4132	1,000	,931
4,4454	1,000	,897
4,4804	1,000	,862
4,5112	1,000	,828
4,5163	1,000	,793
4,5362	1,000	,759
4,5602	1,000	,724
4,5726	1,000	,690
4,5910	1,000	,655
4,6084	1,000	,621
4,6287	1,000	,586
4,6505	1,000	,552
4,6645	1,000	,517
4,6724	1,000	,483
4,6976	1,000	,448
4,7257	1,000	,414
4,7318	1,000	,379
4,7483	1,000	,345
4,7658	,980	,345
4,7793	,960	,345
4,7953	,960	,310
4,8055	,940	,310
4,8118	,920	,310
4,8145	,900	,310
4,8210	,880	,310
4,8286	,880	,276
4,8334	,880	,241
4,8423	,880	,207

TABELA 11 – continuação

4,8557	,860	,207
4,8673	,840	,207
4,8942	,840	,172
4,9227	,820	,172
4,9465	,800	,172
4,9832	,780	,172
5,0031	,760	,172
5,0139	,740	,172
5,0247	,720	,172
5,0270	,700	,172
5,0424	,700	,138
5,0582	,680	,138
5,0751	,680	,103
5,0925	,660	,103
5,0999	,640	,103
5,1236	,620	,103
5,1430	,600	,103
5,1835	,600	,069
5,2283	,580	,069
5,2378	,560	,069
5,2511	,560	,034
5,2631	,540	,034
5,2742	,520	,034
5,2868	,500	,034
5,3008	,480	,034
5,3113	,460	,034
5,3290	,440	,034
5,3727	,420	,034
5,4100	,400	,034
5,4296	,380	,034
5,4399	,360	,034
5,4700	,340	,034
5,5242	,340	,000
5,5512	,320	,000
5,5541	,300	,000
5,5592	,280	,000
5,6007	,260	,000
5,6437	,240	,000
5,6648	,220	,000
5,7257	,200	,000
5,7725	,180	,000
5,8564	,160	,000
5,9439	,140	,000
6,0030	,120	,000
6,0602	,100	,000
6,0671	,080	,000
6,0855	,060	,000
6,4015	,040	,000
6,8391	,020	,000
7,9760	,000	,000

TABELA 12 – Comparação das médias da concentração do colágeno IV de acordo com a classificação subjetiva da fibrose, usando o teste ANOVA

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	p
Entre grupos	226404,327	3	75468,109	0,828	0,483
Dentro dos grupos	6838586,572	75	91181,154	-	-
Total	7064990,899	78	-	-	-

* grau de liberdade

TABELA 13 – Comparação das médias do calibre da veia porta de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde

	Soma dos quadrados	gl [§]	Média quadrados	F	p
Entre grupos	152,076	3	50,692	9,262	,000
Dentro dos grupos	394,082	72	5,473	-	-
Total	546,158	75	-	-	-

	Padrões OMS	n	Subgrupos para $\alpha = 0,05^*$	
			1	2
Tukey b **	A	29	9,6207	-
	CDDc	23	9,8261	-
	F	4	10,5000	-
	EEc	20	-	12,9500

[§] graus de liberdade. * Análise de subgrupos homogêneos: valores médios para cada subgrupo. ** Média harmônica para o tamanho da amostra = 10,583. ** Variâncias homogêneas ($p = 0,187$)

TABELA 14 – Comparação das medianas do calibre da veia esplênica de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	p
Entre grupos	176,008	3	58,669	13,952	0,000
Dentro dos grupos	290,157	69	4,205	-	-
Total	466,164	72	-	-	-
A x CDDc**	-	-	-	-	0,715
A x EEc**	-	-	-	-	0,006
A x F**	-	-	-	-	0,696
CDDc x EEc**	-	-	-	-	0,002
CDDc x F**	-	-	-	-	0,545
EEc x F**	-	-	-	-	0,971

* grau de liberdade. ** Teste não paramétrico para variâncias não homogêneas ($p = 0,000$)

TABELA 15 – Comparação das medianas do calibre da veia mesentérica superior de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	<i>p</i>
Entre grupos	166,041	3	55,347	14,545	0,000
Dentro dos grupos	277,777	73	3,805	-	-
Total	443,818	76	-	-	-
A x CDDc**	-	-	-	-	0,483
A x EEc**	-	-	-	-	0,000
A x F**	-	-	-	-	0,102
CDDc x EEc**	-	-	-	-	0,002
CDDc x F**	-	-	-	-	0,220
EEc x F**	-	-	-	-	1,000

* grau de liberdade. ** Teste não paramétrico para variâncias não homogêneas ($p = 0,024$)

TABELA 16 – Comparação das medianas do diâmetro longitudinal do baço de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde

	Soma dos quadrados	gl*	Média quadrados	F	<i>p</i>
Entre grupos	39939,048	3	13313,016	16,192	0,000
Dentro dos grupos	54264,738	66	822,193	-	-
Total	94203,786	69	-	-	-
A x CDDc**	-	-	-	-	0,809
A x EEc**	-	-	-	-	0,000
A x F**	-	-	-	-	0,667
CDDc x EEc**	-	-	-	-	0,000
CDDc x F**	-	-	-	-	0,795
EEc x F**	-	-	-	-	0,996

* grau de liberdade. ** Teste não paramétrico para variâncias não homogêneas ($p = 0,001$)

TABELA 17 – Análise de regressão múltipla para a concentração do ácido hialurônico

Modelo	R^2 ajustado	Variável	Coefficiente	Erro padrão	IC95%	F	p
1	0,536	Fibrose periportal	0,403	0,348	0,244-0,562	27,62	0,000
2-13	0,540	Fibrose periportal	0,403	0,347	0,258-0,548	32,64	0,000
14	0,625	Constante	4,245	0,157	3,927-4,557	5,46	0,023
		Fibrose periportal	0,336	0,049	0,237-0,434	-	-
		Idade	0,010	0,003	0,004-0,016	-	-
		colaterais	0,316	0,135	0,045-0,587	-	-

TABELA 18 – Acurácia diagnóstica do ácido hialurônico para a fibrose e hipertensão portal

	AUC*	IC 95%**
Fibrose	0,88	0,82-0,97
Veia porta > 12 mm	0,76	0,64-0,88
Baço > 120 mm	0,73	0,60-0,86
Circulação colateral	0,86	0,77-0,95

*AUC: área sob a curva ROC. ** Intervalo de confiança

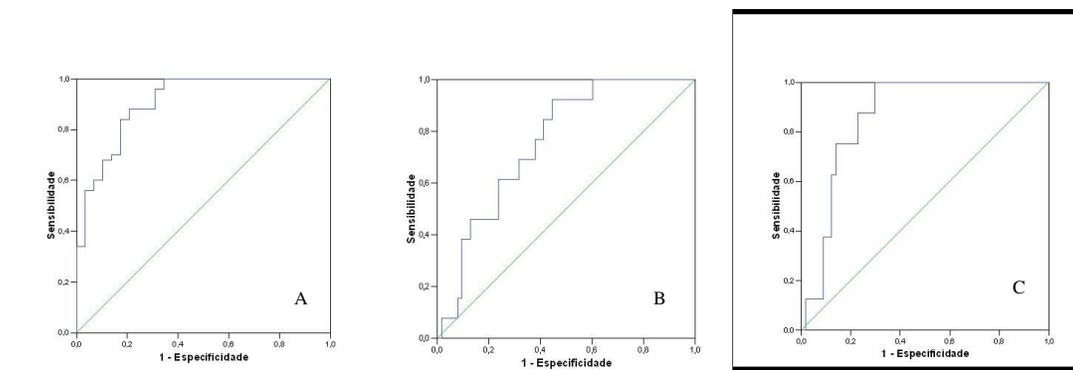


GRÁFICO 8 - Curva ROC para o ácido hialurônico. A. Veia porta. B. Diâmetro do baço. C. Circulação colateral.

Termo de consentimento para inclusão em protocolo de pesquisa

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa

Introdução: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa denominada: “Avaliação ultra-sonográfica da lesão hepática da esquistossomose mansoni em área de alta prevalência no Estado da Bahia e da sua correlação com marcadores bioquímicos de fibrose”.

Nosso objetivo é verificar a existência de exames que possam ser realizados no sangue que sejam capazes de identificar a presença e o estágio em que se encontram possíveis lesões do fígado causadas pela esquistossomose.

Esclarecimentos: Nosso grupo realizará, além do exame físico e ultra-som abdominal de cada participante, coleta de pequena amostra de sangue para a realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa.

O exame de ultra-som não oferece riscos ao paciente e pode beneficiá-lo com o conhecimento do estágio evolutivo de sua doença. A técnica para coleta do sangue é idêntica à técnica utilizada para exames de sangue comuns, sendo desprezíveis os riscos para o paciente. Todos os dados obtidos serão utilizados exclusivamente com a finalidade de pesquisa. Os dados que identificam o paciente serão mantidos em sigilo. Nenhum paciente deixará de receber cuidados ou tratamento por ter se recusado a participar da pesquisa.

Termo de consentimento: Eu, _____ declaro que fui bem informado a respeito da pesquisa “Avaliação ultra-sonográfica da lesão hepática...” e estou ciente de que não corro quaisquer riscos decorrentes da realização do ultra-som, de que os riscos decorrentes da coleta de sangue são muito pequenos e de que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas para fins de pesquisa.

Santa Maria da Vitória, _____ de _____ de _____.

Paciente ou responsável legal

Participante menor (7 a 11 anos)

Participante menor (12 a 17 anos)

Testemunha

Pesquisadores:

Prof. José Roberto Lambertucci – tel. (31) 32489820

Carolina Coimbra Marinho – tel. (31) 30112752

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG – tel. (31) 3499-4592

ANEXOS**ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética da UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 140/05

Interessado: Prof. Dr. José Roberto Lambertucci
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 15 de junho de 2005, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Avaliação Ultra-Sonográfica da Lesão Hepática da Esquistossomose Mansoni em Área de Alta Prevalência no Estado da Bahia e sua Correlação com Marcadores Bioquímicos de Fibrose** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

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


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

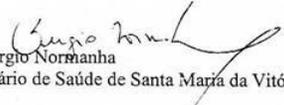
ANEXO 2. Carta de concordância da Secretaria Municipal de Santa Maria da Vitória

Ao
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Santa Maria da Vitória, 25 de fevereiro de 2005.

Prezados senhores,

Cientes do projeto de pesquisa "Avaliação ultra-sonográfica da lesão hepática da esquistossomose mansoni em área de alta prevalência no Estado da Bahia e sua correlação com marcadores bioquímicos de fibrose", sob responsabilidade do Prof. José Roberto Lambertucci, vimos por esta confirmar nossa aprovação para seu desenvolvimento na cidade de Santa Maria da Vitória junto aos moradores das localidades pertencentes ao município.


Dr. Sérgio Normanha
Secretário de Saúde de Santa Maria da Vitória

ANEXO 3. Termo de concordância do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB – UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia¹
Av. Antônio Carlos, 6627
31270-901 Belo Horizonte - MG - Brasil
Fone/Fax: +55 31 3499- 2651

UFMG

Belo Horizonte, 23 de março de 2005

Ao
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina – UFMG

Belo Horizonte, 22 de março de 2005.

Declaro estar ciente do projeto "Avaliação ultra-sonográfica da lesão hepática da esquistossomose mansoni em área de alta prevalência no Estado da Bahia e sua correlação com marcadores bioquímicos de fibrose" e que o Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG concorda em realizar as dosagens dos marcadores bioquímicos de fibrose propostos no projeto de pesquisa.

Mauro Martins Teixeira

¹ Mauro Martins Teixeira MD PhD
Immunopharmacology,
Associate Professor,
mmtex@icb.ufmg.br

ANEXO 4. Termo de concordância do Laboratório Micra

μ Micra
Laboratório 24 horas

DECLARAÇÃO

O Laboratório Micra Biotecnologia LTDA assume o compromisso de realizar os testes para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HbsAg), anticorpos contra o antígeno de superfície (anti-HBs) e de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) do projeto intitulado: "Avaliação Ultra-sonográfica da lesão hepática da esquistossomose mansoni em área endêmica do Estado da Bahia e sua correlação com marcadores bioquímicos de fibrose", da aluna do mestrado em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, sob orientação do Professor José Roberto Lambertucci. Belo Horizonte, 04 de abril de 2005.

Dr. José Carlos Serufo
Laboratório Micra

ANEXO 5. Protocolo individual de pesquisa

FPE
PA
Ed W

Nú
Copie em todas

Jaci Soares Jesus
Água Quente- 5
11/03/43

PROTÓCOLO DE PESQUISA

FICHA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA / EXAMES / ULTRASSOM EM CAMPO / TRATAMENTO

1- IDENTIFICAÇÃO

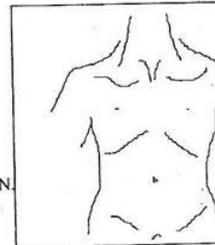
1.1 - Nome do paciente: _____ Apelido: _____
 1.2 - Número: /...../ - /...../ - /...../
 Área casa paciente
 1.3 - Naturalidade: Água Quente
 1.4 - Idade: /...../ a /...../ m 1.5 - Sexo: 1/...../ Masculino 2/...../ Feminino
 1.6 - Estado civil: 1/...../ Solteiro 2/...../ Casado 3/...../ Viúvo 4/...../ Outros
 1.7 - Cor: 1/...../ Branca 2/...../ Preta 3/...../ Morena 1.8 - Escolaridade: 1ª série 1º-G

2 - TRATAMENTO ANTERIOR

2.1 - Esquistossomose 1/...../ Não 2/...../ Sim Data: ± 5 anos
 2.2 - Sangramento digestivo 1/...../ Não 2/...../ Sim Data: 02 dias
 2.3 - Transusão 1/...../ Não 2/...../ Sim Data: /...../ /...../
 2.4 - Injeções 1/...../ Não 2/...../ Sim Data: ± 1 ano
 2.5 - Manipulação dentária 1/...../ Não 2/...../ Sim Data: ± 10 anos
 2.6 - Alcool: Beba purga todos dias ml/dia Evita

3 - EXAME FÍSICO

3.1 - Peso: /...../ Kg: /...../ g 3.2 - Altura: /...../ cm
 3.3 - P.A.: /...../ /...../ /...../ mmHg 3.4 - Pulso: /...../ /...../ bpm
 3.5 - Estado geral: 1/...../ B 2/...../ R 3/...../ P
 3.6 - Ausculta: 1/...../ Normal 2/...../ Alterada Descrição:
 3.7 - Abdome: 1/...../ Ascite 2/...../ Circulação colateral 3/...../ Ausência
 3.8 - Fígado: 1/...../ Palpável 2/...../ Não Palpável
 Se palpável: Direito: /...../ cm da RCD
 Esquerdo: /...../ cm do Ap. Xifóide
 Superfície: 1/...../ Lisa 2/...../ Nodular 88/...../ N.A.
 Consistência: 1/...../ Normal 2/...../ Endurecida 3/...../ Dura 88/...../ N.A.
 3.9 - Baço: 1/...../ Palpável 2/...../ Não Palpável
 Se palpável: /...../ cm do RCE
 Consistência: 1/...../ Normal 2/...../ Endurecida 3/...../ Dura 88/...../ N.A.



4 - EXAMES COMPLEMENTARES 4.1 - Controle de realização de exames:

EPE: 1/...../ Sim em /...../ SORO: 1/...../ Sim em /...../ US: 1/...../ Sim em /...../

4.2 - Parasitológico de fezes:

Ovos de *S. mansoni* 1/...../ Não /...../ Sim Média de ovos/g: /...../ g
 L1: /...../ L2: /...../ L3: /...../
 L4: /...../ L5: /...../ L6: /...../
 L7: /...../ L8: /...../ Outros parasitas:
 1/...../ Ascaris 2/...../ Tricocephalus 3/...../ Ancilostoma 4/...../ Nenhum 5/...../ Outros

FPE
PA
Ced W

Nú
Copie em todas

Jaci Soares Jesus
Água Quente- 5
11/03/43

PROTOCOLO DE PESQUISA

FICHA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA / EXAMES / ULTRASSOM EM CAMPO / TRATAMENTO

1- IDENTIFICAÇÃO

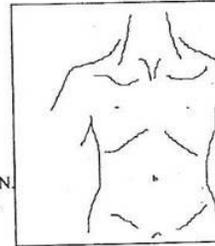
1.1 - Nome do paciente: _____ Apelido: _____
 1.2 - Número: /...../ - /...../ - /...../
 Área casa paciente
 1.3 - Naturalidade: Água Quente
 1.4 - Idade: 61 a /...../ m 1.5 - Sexo: 1/ Masculino 2/...../ Feminino
 1.6 - Estado civil: 1/ Solteiro 2/...../ Casado 3/...../ Viúvo 4/...../ Outros
 1.7 - Cor: 1/...../ Branca 2/...../ Preta 3/ Morena 1.8 - Escolaridade: 1ª série 1º G

2 - TRATAMENTO ANTERIOR

2.1 - Esquistossomose 1/...../ Não 2/ Sim Data: ± 5 anos
 2.2 - Sangramento digestivo 1/...../ Não 2/ Sim Data: 02 dias
 2.3 - Transusão 1/ Não 2/...../ Sim Data: /...../
 2.4 - Injeções 1/...../ Não 2/ Sim Data: ± 1 ano
 2.5 - Manipulação dentária 1/...../ Não 2/ Sim Data: ± 10 anos
 2.6 - Álcool: Beba purga todos dias mL/dia Evita

3 - EXAME FÍSICO

3.1 - Peso: /...../ Kg: /...../ g 3.2 - Altura: /...../ cm
 3.3 - P.A.: /...../ : /...../ : /...../ mmHg 3.4 - Pulso: /...../ : /...../ bpm
 3.5 - Estado geral: 1/ B 2/...../ R 3/...../ P
 3.6 - Ausculta: 1/...../ Normal 2/...../ Alterada Descrição:
 3.7 - Abdome: 1/...../ Ascite 2/...../ Circulação colateral 3/ Ausência
 3.8 - Fígado: 1/...../ Palpável 2/ Não Palpável
 Se palpável: Direito: /...../ cm da RCD
 Esquerdo: /...../ cm do Ap. Xifóide
 Superfície: 1/...../ Lisa 2/...../ Nodular 88/...../ N.A.
 Consistência: 1/...../ Normal 2/...../ Endurecida 3/...../ Dura 88/...../ N.A.
 3.9 - Baço: 1/...../ Palpável 2/ Não Palpável
 Se palpável: /...../ cm do RCF
 Consistência: 1/...../ Normal 2/...../ Endurecida 3/...../ Dura 88/...../ N.A.



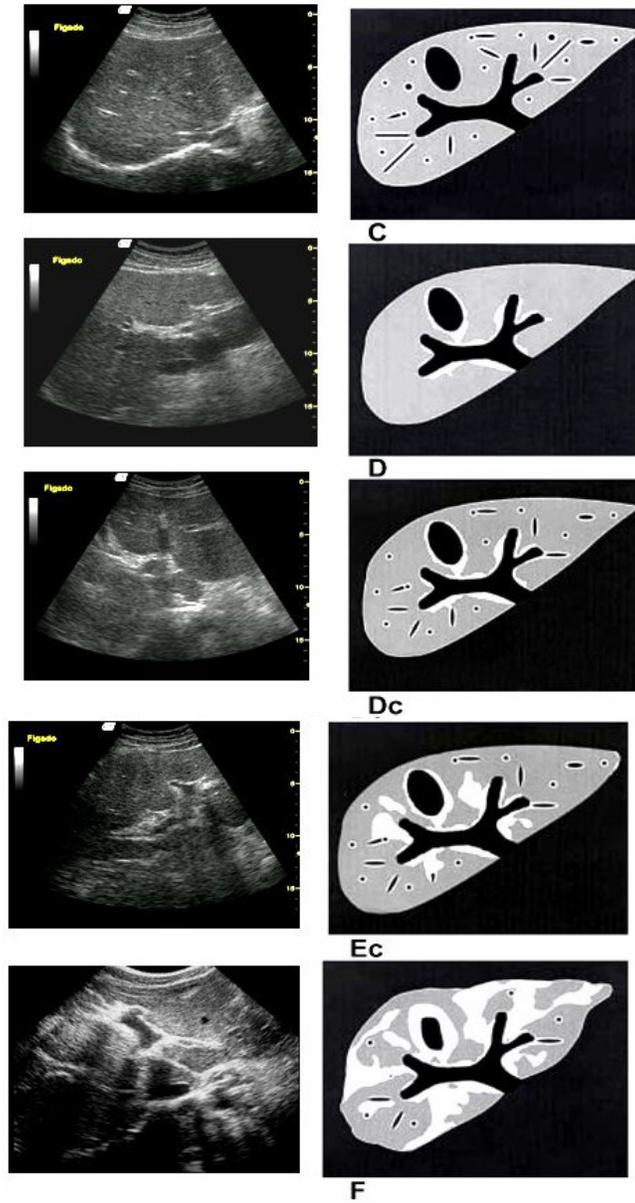
4 - EXAMES COMPLEMENTARES 4.1 - Controle de realização de exames:

EPE: 1/...../ Sim em /...../ SORO: 1/...../ Sim e /...../ US: 1/...../ Sim em /...../

4.2 - Parasitológico de fezes:

Ovos de *S. mansoni* 1/...../ Não /...../ Sim Média de ovos/g: /...../ g
 L1: /...../ L2: /...../ L3: /...../
 L4: /...../ L5: /...../ L6: /...../
 L7: /...../ L8: /...../ Outros parasitas:
 1/...../ Ascaris 2/...../ Tricocephalus 3/...../ Ancilostoma 4/...../ Nenhum 5/...../ Outros

ANEXO 6. Padrões da OMS para diagnóstico ultra-sonográfico qualitativo de fibrose hepática (NIAMEY WORKING GROUP, 2000)



ANEXO 7. Parâmetros para o diagnóstico ultra-sonográfico quantitativo de fibrose hepática e hipertensão portal na esquistossomose mansoni de acordo com a OMS (NIAMEY WORKING GROUP, 2000)

	Valor de referência (mm)
Diâmetro longitudinal do lobo direito do fígado*	100
Diâmetro longitudinal do lobo esquerdo do fígado**	90
Diâmetro longitudinal do baço [§]	120
Calibre da veia porta ^{§§}	12
Calibre da veia esplênica ^{§§}	9
Calibre da veia mesentérica superior ^{§§}	9
Espessura da parede dos ramos secundários da veia porta ^{§§}	4
Espessura da parede da vesícula	4

* Linha axilar anterior. **Secção longitudinal, linha paraesternal E a 2 cm do apêndice xifóide. [§] Janela oblíqua E. ^{§§} Na figura: a: diâmetro externo, b: diâmetro interno (calibre do vaso), a – b: espessura da parede do vaso

