



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELLA BEZERRA DUARTE

**ESTUDO DOS EXOSSOMAS URINÁRIOS EM PACIENTES COM
ESQUISTOSSOMOSE HEPATOSPLÊNICA COMPENSADA**

FORTALEZA

2020

DANIELLA BEZERRA DUARTE

**ESTUDO DOS EXOSSOMAS URINÁRIOS EM PACIENTES COM
ESQUISTOSSOMOSE HEPATOSPLÊNICA COMPENSADA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Medicina

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth De
Francesco Daher

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D871e Duarte, Daniella Bezerra.

Estudo dos exossomas urinários em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica compensada / Daniella Bezerra Duarte. – 2020.

80 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher.

1. Esquistossomose. 2. Exossomas Urinários. 3. Avaliação. I. Título.

CDD 610

Daniella Bezerra Duarte

**ESTUDO DOS EXOSSOMAS URINÁRIOS EM PACIENTES COM
ESQUISTOSSOMOSE HEPATOSPLÊNICA COMPENSADA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Elizabeth De Francesco Daher (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. José Milton de Castro Lima
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Dânya Bandeira Lima
Universidade Federal do Ceará - UFCE

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Doutora Elizabeth De Francesco Daher, por acreditar em meu potencial, sempre disponível às minhas questões e entusiasmada com a pesquisa clínica. Ela é referência profissional e pessoal para o meu crescimento.

Ao farmacêutico e pós-doutorando em Ciências Médicas, Gdayllon Cavalcante, pela amizade, parceria, disponibilidade e pelo suporte durante a realização da pesquisa e do mestrado.

Às secretárias do Mestrado em Ciências Médicas, Ivone Mary Fontenele de Sousa e Rita de Cássia de Almeida Antunes, pelo carinho, auxílio e presteza.

À farmacêutica e Doutora em Ciências Farmacêuticas, Dânya Bandeira, pelo apoio para a realização dos exames dos pacientes e ajuda no manejo das amostras de material biológico coletado nesta pesquisa.

À Dr.^a Andrea Agra, do ambulatório de Hepatologia, pela cooperação indispensável para realização deste projeto mediante o encaminhamento de seus pacientes.

À amiga, irmã e comadre, Maria Zenaide Ribeiro, por me haver proporcionado o encontro com minha orientadora, pelo apoio e incentivo constante.

Aos meus pais, João e Lúcia, pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional. A vocês, minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs, Patrícia e Ana e a todos os membros da minha família, pelo apoio de sempre em tudo e durante toda a minha vida.

A Deus, pelo dom da vida.

*“Conhecer não é demonstrar nem explicar, é
aceder à visão”.*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Introdução - A infecção por *Schistosoma mansoni* é considerada um problema de saúde pública. O envolvimento glomerular na esquistossomose é uma complicação bem documentada, especialmente na esquistossomose hepatoesplênica (EHE). No entanto, a função tubular renal é mal compreendida. O objetivo deste estudo foi investigar, através de exossomas urinários, os transportadores tubulares renais em pacientes com EHE. **Métodos** - Este é um estudo transversal de 17 pacientes com EHE que tiveram exossomas isolados de amostras de urina. Foi adicionado um inibidor de protease nas amostras de urina que foram imediatamente congeladas a -80°C para um maior isolamento dos exossomas. Após o descongelamento da urina, os exossomas urinários foram obtidos usando extensas etapas de vórtice, centrifugação e ultracentrifugação da urina. A expressão dos exossomas urinários foi avaliada por western blot, investigando AQP2 e NKCC2. As quantidades de carga para eletroforese em gel foram ajustadas pela concentração de creatinina urinária de cada paciente para evitar o viés de concentração urinária. A expressão proteica dos pacientes com EHE foi comparada a controles saudáveis. **Resultados** - A expressão de aquaporina-2 (AQP2) foi menor em pacientes com EHE do que nos controles ($46,8 \pm 40,7$ vs $100 \pm 70,2\%$, $P = 0,03$) e a expressão do co-transportador NKCC2 foi maior ($191,7 \pm 248,6$ vs $100 \pm 43,6\%$, $P = 0,01$). Os níveis de AQP2 se correlacionaram positivamente com a osmolaridade urinária ($r = 0,57$; $P = 0,04$) e negativamente com o pH urinário ($r = -0,60$; $P = 0,03$). Por sua vez, os valores de NKCC2 se correlacionaram positivamente com a fração de excreção de potássio (FeK) ($r = 0,60$; $P = 0,02$) e pH urinário ($r = 0,55$; $P = 0,03$). **Conclusões** - A diminuição de AQP2 e o aumento da expressão do NKCC2 em pacientes com EHE parecem estar envolvidos com a inabilidade de concentração e acidificação urinária nesses pacientes. Estes dados mostram anormalidades tubulares renais em pacientes com EHE sem doença clínica renal manifesta.

Palavras-chave: esquistossomose hepatoesplênica; função tubular renal; exossomas urinários; aquaporina-2; NKCC2.

ABSTRACT

Background - *Schistosoma mansoni* infection is considered a public health problem. Glomerular involvement in schistosomiasis is a well-documented complication, especially in hepatosplenic schistosomiasis (HSS). However, renal tubular function is poorly understood. The aim of this study was to investigate, through urinary exosomes, tubular transporters functionally in HSS patients. **Methods** - This is a cross-sectional study of 17 HSS patients who had isolated exosomes from urine samples. Protease inhibitor was added in the urine samples that were immediately frozen at -80°C for further exosomes isolation. After urine thawed, urinary exosomes was obtained using extensive vortexing, centrifugation and ultracentrifugation steps of urine. Urinary transporters expression from exosomes were evaluated by western blot, including AQP2 and NKCC2. Charge amounts for gel electrophoresis was adjusted by urinary creatinine concentration of each patient to avoid urinary concentration bias. All protein expression of HSS patients was relative to healthy controls. **Results** - The expression of aquaporin-2 (AQP2) was lower in HSS patients than in controls (46.8 ± 40.7 vs $100 \pm 70.2\%$, $p = 0.03$) and the expression of the NKCC2 co-transporter was higher (191.7 ± 248.6 vs $100 \pm 43.6\%$, $p=0.01$). AQP2 levels correlated positively with urinary osmolarity ($r=0.57$; $P=0.04$) and correlated negatively with urinary pH ($r=-0.60$; $P=0.03$). In turn, the values of NKCC2 correlated positively with the urinary fractional excretion of potassium (FE_K) ($r=0.60$; $P=0.02$) and urinary pH ($r=0.55$; $P=0.03$). **Conclusions** - The decrease of AQP2 and the increase of NKCC2 expression in HSS patients seem to be involved with the inability of urinary concentration and acidification in these patients. These data show renal tubular abnormalities in HSS patients without manifest clinical renal disease.

Keywords: hepatosplenic schistosomiasis; renal tubular function; urinary exosomes; aquaporin-2; NKCC2.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos	20
Figura 2	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 3	Esquema da formação de exossomas e liberação na urina	32
Figura 4	Distribuição dos pacientes portadores de esquistossomose entrevistados e motivos de exclusão nas duas fases do estudo	45
Figura 5	Expressão de aquaporina-2 por western blot em exossomas urinários em pacientes com EHE e controles saudáveis	50
Figura 6	Expressão de NKCC2 por western blot em exossomas urinários em pacientes com EHE e controles saudáveis	51
Figura 7	Correlação aquaporina-2 e osmolaridade urinária entre pacientes com EHE	52
Figura 8	Correlação aquaporina-2 e pH urinário entre pacientes com EHE	52
Figura 9	Correlação NKCC2 e FeK entre pacientes com EHE	53
Figura 10	Correlação NKCC2 e pH urinário entre pacientes com EHE	53
Tabela 1	Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com EHE e do grupo-controle	46
Tabela 2	Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento dos pacientes com EHE	47
Tabela 3	Comparação dos parâmetros de função renal entre os pacientes com EHE e o grupo-controle	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio antidiurético
ALT	Alanina aminotransferase
AQP2	Aquaporina-2
AST	Aspartato aminotransferase
C3	Complemento – C3
C4	Complemento – C4
CAA	Antígeno anódico circulante
CCA	Antígeno catódico circulante
DRC	Doença renal crônica
DRCT	Doença renal crônica terminal
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
FA	Fosfatase alcalina
FE_K	Fração de excreção de potássio
FE_{Mg}	Fração de excreção de magnésio
FE_{Na}	Fração de excreção de sódio
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GESF	Glomerulosclerose segmentar e focal
GGT	Gama-glutamilttransferase
HSS	<i>Hepatosplenic schistosomiasis</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMC	Índice de massa corporal
KIM-1	Molécula de injúria renal-1

LRA	Lesão Renal Aguda
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica
NHE3	Trocador sódio-hidrogênio do tipo 3
NKCC2	Sódio-potássio-2-Cloro
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
SISPCE	Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TcH₂O	Transporte de água livre de solutos
TFG	Taxa de filtração glomerular
TTKG	Gradiente de transporte transtubular de potássio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Epidemiologia da esquistossomose	18
2.2	Ciclo da doença	20
2.3	Quadro clínico da esquistossomose	22
2.4	Alterações renais na esquistossomose	24
2.4.1	Glomerulopatia esquistossomótica	24
2.4.2	Alterações tubulares na esquistossomose	28
2.4.3	Lesão renal aguda na esquistossomose	29
2.4.4	Biomarcadores de lesão renal na esquistossomose	30
2.4.4.1	Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1)	30
2.4.4.2	Exossomas urinários	31
2.5	Tratamento e evolução	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	METODOLOGIA	39
4.1	Tipo de estudo	39
4.2	Caracterização do local do estudo	39
4.3	Critérios de inclusão	39
4.4	Critérios de exclusão	39
4.5	Protocolo do diagnóstico	40
4.6	Primeira fase do estudo	40
4.7	Segunda fase do estudo	41
4.8	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	45

6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo cinco as espécies que parasitam o homem: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. No Brasil, encontramos apenas o *S. mansoni*, presente em 19 unidades federadas, com maior endemicidade observada nos estados do Nordeste (MAHMOUD, 1997; DOMINGUES; NOVAIS, 2004).

É uma doença tropical negligenciada que ocorre entre as populações mais pobres, especialmente em locais sem acesso à água potável e condições sanitárias precárias (OMS, 2016). Estima-se que 230 milhões de pessoas estão infectadas com *Schistosoma spp* no mundo inteiro (COLLEY et al., 2014).

A esquistossomose está associada a grande morbidade e mortalidade, sendo as complicações crônicas geralmente vistas em pessoas com elevada carga parasitária, o que geralmente ocorre naqueles que vivem em áreas endêmicas e submetidos à exposição de repetição (BLANCHARD, 2004). Na dependência da carga parasitária de cada indivíduo e de sua resposta imune, amplo espectro de formas clínicas pode se expressar. A maioria dos indivíduos exibe as formas leves da doença (assintomática, intestinal e hepatointestinal). Já a forma hepatoesplênica é encontrada entre 4% e 7% dos infectados, estando associada a grande infestação parasitária (DOMINGUES; NOVAIS, 2004).

O envolvimento renal na esquistossomose mansônica é bem documentado, com diversos trabalhos mostrando a associação entre a doença e alterações glomerulares, sobretudo naqueles pacientes com a forma hepatoesplênica (BARSOUM; NABIL; SAADY, 1996; NUSSENZVEIG et al., 2002; BARSOUM, 2004; MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006). A natureza imunológica da lesão glomerular está bem estabelecida e depende da liberação de moléculas antigênicas produzidas pelo parasita, desencadeando a formação de complexos imunes que se depositam nos glomérulos (MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006; MELO; SILVEIRA; MARTINELLI, 2006). Análise de material de biópsia renal de pacientes com síndrome nefrótica revelou que a glomerulonefrite

membranoproliferativa é a alteração histológica mais frequentemente encontrada (ANDRADE; VAN MARK, 1987).

A pesquisa de alterações subclínicas, através de exames séricos e urinários, pode ser útil para o diagnóstico precoce do envolvimento renal na esquistossomose e para a consequente prevenção da progressão da doença renal. As alterações da função renal são assintomáticas na maioria dos casos, e o paciente pode só desenvolver sintomas quando ocorre perda significativa de função renal (DUARTE et al., 2014).

Ao contrário do que acontece com a glomerulopatia esquistossomótica, o envolvimento tubular na esquistossomose tem sido pouco descrito na literatura. Apenas um estudo do nosso grupo mostrou que pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (EHE) com filtração glomerular preservada apresentam uma incidência elevada de alterações tubulares, com incapacidade de concentração urinária presente em 85% dos casos e déficit de acidificação urinária em 45% (DUARTE et al., 2014).

Uma forma de melhor compreender as alterações glomerulares e principalmente tubulares na esquistossomose mansônica seria através da identificação dos exossomas urinários. Os exossomas foram descritos pela primeira vez por Rose Johnstone em 1980. Consistem de nanovesículas (30-100nm) de origem endocítica que são secretadas no espaço extracelular ou fluidos corporais quando um corpo multivesicular funde-se com a membrana plasmática (DIMOV; VELICKOVIC; STEFANOVIC, 2009).

O presente estudo foi realizado para avaliar a expressão de exossomas urinários de um grupo de pacientes portadores de EHE compensada, acompanhados em um ambulatório especializado na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil. Na literatura médica vigente não há estudos que demonstrem alterações em exossomas urinários em pacientes portadores de esquistossomose, sendo este o primeiro a discorrer sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença tropical presente em cerca de 70 países, principalmente na África, Leste do Mediterrâneo e América do Sul. Estima-se um total de 230 milhões de pessoas infectadas, 85% das quais vivem na África subsaariana, aproximadamente 120 milhões desenvolvem sintomas, 20 milhões têm doença grave e 100 mil morrem a cada ano (CHITSULO; LOVERDE; ENGELS, 2004; MAGUIRE, 2010; COLLEY et al., 2014). Foi trazida pelos escravos africanos e se dispersou para as Américas do Sul e Central, e região do Caribe, sendo inicialmente detectada pelo médico Augusto Pirajá da Silva, no Estado da Bahia. É classificada pela OMS entre as doenças tropicais negligenciadas (MOLYNEU; HOTEZ; FENWICK, 2005) e continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias nos trópicos e regiões subtropicais, constituindo importante problema de saúde pública (VANDERWERF et al., 2003; STEINMANN et al., 2006).

As espécies de *Schistosoma* variam de acordo com a área geográfica. *S. mansoni* ocorre na América do Sul, ilhas do Caribe, e, juntamente com *S. haematobium*, na África e no Oriente Médio. *S. haematobium* também é observado em parte da África Central e Ocidental. *S. japonicum* e *S. mekongi* ocorrem em vários países do sudeste asiático, e *S. japonicum* também é encontrado na China e nas Filipinas. A transmissão é focal nos países endêmicos e mais intensa em áreas rurais pobres, com saneamento inadequado e sem abastecimento de água (MAGUIRE, 2010).

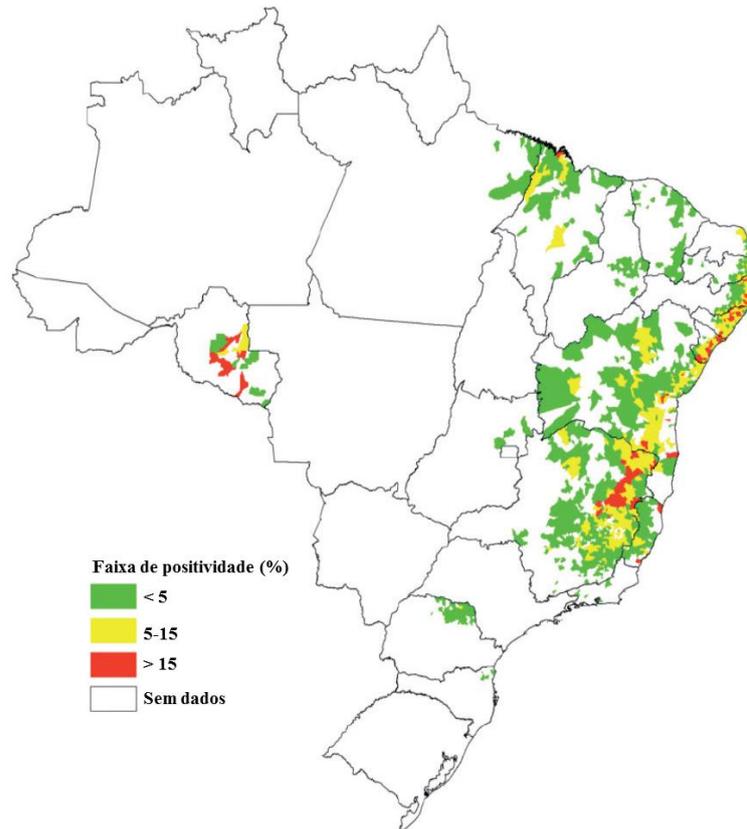
Na América, a esquistossomose é mais prevalente na região do Caribe, Venezuela e Brasil, onde a doença é endêmica (MAGUIRE, 2010). Apesar dos esforços para o seu controle, o Brasil é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados, estimando-se que afete 4,6% da população, ou seja, aproximadamente oito milhões de pessoas (PASSOS; AMARAL, 1998; KATZ; PEIXOTO, 2000; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Foi descrita em quase todo o Território Nacional, mas com maior prevalência nos estados do Nordeste. Sua ocorrência está diretamente relacionada com a presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*. A espécie *Biomphalaria*

glabrata é responsável pela transmissão da esquistossomose em quase todas as regiões onde a doença ocorre com taxas de infecção superiores a 50%. O molusco pode ser encontrado em coleções hídricas artificiais e naturais de água doce, água parada ou de baixa correnteza, desde rios, lagoas, valas e pequenas poças. O gênero *Biomphalaria* possui a capacidade de se adaptar a diferentes habitat e são facilmente adaptadas a ambientes costeiros com alta salinidade (LEAL NETO et al., 2013). Sua ocorrência era restrita ao ambiente de água doce, entretanto atualmente podem ser encontrados em coleções hídricas salinas e salobras. O ambiente salino pode conduzir a seleção de populações de moluscos mais resistentes e o ambiente salobro, por apresentar uma diversidade de fitoplâncton, pode contribuir para a proliferação de *B. glabrata* (BEZERRA DA SILVA et al., 2006).

Estima-se que existam 25 milhões de pessoas no país em risco de contrair a doença (BRASIL, 2010). A figura 1 mostra a distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos no ano de 2012 (BRASIL, 2012).

Atualmente, Alagoas é o estado do Brasil com maior registro de casos confirmados da doença, foram 6.416 em 2016 de um total de 12.009 em todo o país, o que corresponde a mais de 50% dos casos registrados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Cerca de 60% do Território Alagoano é área endêmica e mais de dois milhões de indivíduos estão expostos à infecção (FUNASA, 1995; BRASIL, 2012). A disseminação da doença em Alagoas deve-se a existência no estado de fatores endêmicos básicos para a viabilidade de todo o ciclo da doença como a presença do hospedeiro definitivo, presença do hospedeiro intermediário (planorbídeos do gênero *Biomphalaria*), grande distribuição geográfica e alta resistência do hospedeiro intermediário à seca; presença de meios aquáticos adequados para a disseminação do hospedeiro intermediário no qual a população tenha contato direto seja para atividades domésticas, agrícolas ou de lazer; depósito de esgoto nessas águas ou próximo a elas (VITORINO et al., 2012). Além disso, a elevada prevalência da esquistossomose está diretamente relacionada ao baixo nível de renda e escolaridade da população, condições marcantes no Estado de Alagoas (BARRETO et al., 2015).

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS (BRASIL, 2012).

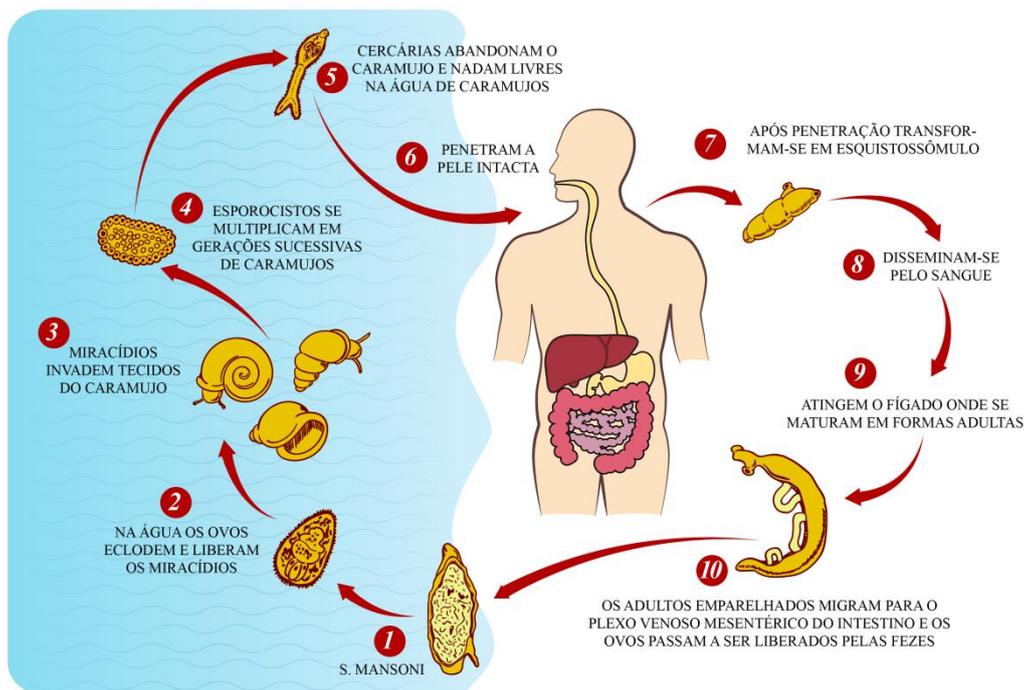
2.2 Ciclo da doença

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é complexo e requer um hospedeiro intermediário e um definitivo. O homem é o hospedeiro definitivo do *S. mansoni*. Já o hospedeiro intermediário é o caramujo, molusco aquático da família *Planorbidae*, incluído no gênero *Biomphalaria*, cujo *habitat* natural são cursos de água doce de pouca ou nenhuma correnteza, lagos de pequeno porte, brejos, valetas de irrigação, hortas e outros (PASSOS; AMARAL, 1998).

Uma vez eliminados na água, os ovos de *S. mansoni* eclodem, liberando o miracídio, que penetra o hospedeiro intermediário, o caramujo. O miracídio se reproduz assexuadamente até se transformar em larva cercária (forma infectante).

As cercárias deixam o caramujo e penetram a pele intacta de seres humanos, transformando-se em esquistossômulos, que migram para os pulmões e o fígado. Após cerca de seis semanas, evoluem para a forma adulta e migram para o sistema porta (MARTINELLI; SILVEIRA; ROCHA, 2006).

Figura 2 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Duarte et al., 2019. Copyright © 2019.

Após 1-3 meses, o verme fêmea começa a produzir ovos, que podem viajar por via hematogênica para outros locais ou atravessar a parede intestinal, alcançando a luz intestinal e daí serem excretados nas fezes (MAHMOUD, 1997; DOMINGUES; NOVAIS, 2004). Os ovos liberados na corrente sanguínea por vermes adultos podem invadir os tecidos locais, onde liberam toxinas e enzimas e provocam uma resposta TH-2-imunomediada (COUTINHO et al., 2007). A inflamação e a formação de granulomas ocorrem em torno dos ovos depositados, o que pode levar à fibrose dos tecidos afetados, especialmente no fígado (CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000). A figura 2 apresenta de forma resumida o ciclo evolutivo do *S. mansoni*.

2.3 Quadro clínico da esquistossomose

A apresentação clínica da esquistossomose resulta da resposta imune do hospedeiro aos ovos do *Schistosoma* e da reação granulomatosa evocada pelos antígenos que eles secretam. A doença tem uma evolução crônica, com gravidade variável. A evolução depende da resposta imunológica, do desenvolvimento do verme e de sua ovoposição (ROSS et al., 2002). A resposta imune dos indivíduos com esquistossomose inclui componentes humorais, bem como celulares. O grau e a extensão dessa resposta fornece o equilíbrio entre a infestação assintomática e as manifestações da doença (MAHMOUD, 1997).

A maioria dos pacientes infectados é assintomática. Os sintomas agudos são mais comuns em pessoas não imunes, tais como os viajantes, em razão de uma resposta imune mais intensa à exposição. Por outro lado, as complicações crônicas exigem carga maior de infecção e, portanto, são vistas principalmente em indivíduos de áreas endêmicas (CORACHAN, 2002).

A fase aguda ocorre várias semanas após a penetração das cercárias, sendo considerada uma reação alérgica toxêmica à migração e maturação das larvas do *S. mansoni*. Em geral, os sintomas são febre, tosse seca, fraqueza, cefaleia, sintomas abdominais, urticária e/ou angioedema. A gravidade do quadro clínico varia de acordo com a carga parasitária e a resposta imune aos antígenos do parasita, sendo que imunocomplexos circulantes são encontrados em 55-93% dos pacientes com esquistossomose aguda (MOUNTFORD, 2005).

A fase crônica pode ser dividida em três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (BINA, 1981).

Na forma intestinal, os sintomas mais comuns incluem dor abdominal crônica ou intermitente, perda de apetite e diarreia (STEPHENSON, 1993). Pólipos intestinais podem surgir ao redor da inflamação granulomatosa circundante aos ovos depositados na parede do intestino. Úlceras intestinais também podem se desenvolver. Raramente, uma massa inflamatória pode levar à obstrução (LAMYMAN et al., 2006). Na maioria dos casos, os sintomas permanecem discretos, enquanto a carga parasitária for baixa e o acúmulo de ovos nos tecidos pequeno. Nessa forma, as lesões hepáticas são moderadas e os sintomas, - como perda de

apetite, desconforto abdominal, astenia, cólicas intestinais, diarreia e disenteria - são geralmente brandos e bastante variáveis, podendo persistir durante anos, pela dificuldade do diagnóstico, além de haver sintomas similares a outros tipos de doença (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; LAMBERTUCCI et al., 2000).

À medida que os ovos são arrastados pela circulação e se alojam no fígado, a parasitose se agrava, levando o paciente a desenvolver a forma hepatointestinal. Embora a sintomatologia de ambas as formas seja semelhante, as lesões hepáticas na forma hepatointestinal são mais intensas do que na intestinal, com baço e fígado discretamente palpáveis. O quadro clínico pode evoluir e o paciente desenvolver a forma hepatoesplênica, que se caracteriza pelo comprometimento e aumento considerável do fígado e baço (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

Na forma hepatoesplênica, os pacientes podem ser assintomáticos, sendo reconhecidos ao exame clínico pela presença de hepatomegalia às custas do aumento do lobo esquerdo do fígado e esplenomegalia. Expressam, com frequência, queixas gastrintestinais, como dispepsia, flatulência ou diarreia. A hipertensão portal, ocasionada pela fibrose hepática de Symmers, achado típico da forma hepatoesplênica, é a base da patogênese, acarretando consequências clínicas, como o surgimento das varizes do plexo submucoso do esôfago e estômago, e a esplenomegalia, com hiperesplenismo, levando a alterações hematológicas, como plaquetopenia e leucopenia (DOMINGUES; NOVAIS, 2004). Muitos pacientes permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada, conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade, mas podem evoluir para a forma hepatoesplênica descompensada (ANDRADE; VAN MARCK, 1984). Geralmente, essa descompensação ocorre após episódio de sangramento digestivo, que pode acarretar um quadro de insuficiência hepática transitória, caracterizado por ascite, edema periférico, icterícia leve e encefalopatia (DOMINGUES; NOVAIS, 2004). A mortalidade por esquistossomose ocorre principalmente nessa forma. O rompimento das varizes esofágicas leva a hemorragias digestivas graves, muitas vezes fatais (PRATA, 1997; BRASIL, 2006).

2.4 Alterações renais na esquistossomose

O envolvimento glomerular na esquistossomose mansônica é bem documentado, com diversos trabalhos mostrando a associação entre a doença e alterações glomerulares. Mais recentemente, no entanto, têm surgido relatos na literatura acerca do envolvimento dos túbulos renais em pacientes com a doença, assim como também sobre lesão renal aguda (LRA) e novos biomarcadores renais nesses pacientes (HANEMANN et al., 2013; DUARTE et al., 2014, 2015).

2.4.1 Glomerulopatia esquistossomótica

Não há consenso sobre a prevalência do acometimento renal na esquistossomose, variando de acordo com a série avaliada e com fatores geográficos que parecem influenciar os distintos padrões de injúria glomerular (BARSOUM, 1993). No Brasil, é descrita incidência de doença glomerular na esquistossomose, variando entre 5-6%, percentual que se eleva para 15%, quando se consideram apenas os pacientes com a forma hepatoesplênica da doença (VAN VELTHUYSEN, 1996).

Alguns autores sugeriram que a doença renal associada à esquistossomose estava diminuindo no Brasil, como consequência de intervenções terapêuticas em áreas endêmicas iniciadas no final dos anos 1970. Apesar da redução do número de casos de esquistossomose no Brasil, em especial das formas graves da doença decorrente destas intervenções, o acometimento renal não diminuiu (ANDRADE, 1998).

Estudo transversal planejado para atualizar a prevalência atual da doença renal em pacientes com EHE, em um centro de referência em Minas Gerais, de 2007 a 2009, avaliou 63 pacientes com esquistossomose mansônica e encontrou evidência de envolvimento renal em 12,7% dos pacientes, corroborando a ideia de que a prevalência não diminuiu (RODRIGUES et al., 2010).

A natureza imunológica do acometimento glomerular na esquistossomose é bem estabelecida (VAN MARCK, 1983; BARSOUM, 1993; MARTINELLI; ROCHA, 1996). Apesar dos antígenos provenientes do verme adulto serem os mais

relacionados à glomerulopatia esquistossomótica (CARLIER et al., 1975; MADWAR; VOLLER, 1975), antígenos solúveis do ovo também contribuem para a patogênese da glomerulopatia, como demonstrado em estudos experimentais, onde antígenos solúveis do ovo foram localizados ultraestruturalmente por imunomicroscopia nos glomérulos de hamsters injetados com ovos de *S. mansoni* (DE BRITO et al., 1998).

Entre os diversos antígenos isolados, os provenientes do tubo digestivo do verme adulto, de natureza polissacarídea, regurgitados pelo parasita, são os implicados na patogênese da glomerulopatia (DEELDER et al., 1980). Dois antígenos principais do *Schistosoma mansoni*, o antígeno anódico circulante (CAA) e o antígeno catódico circulante (CCA), foram localizados ultraestruturalmente em depósitos glomerulares de humanos e em animais de experimentação infectados com *S. mansoni* (VAN MARCK; DEELDER; GIGASE, 1977; DE WATER et al., 1988).

Os antígenos CAA e CCA são presos pela membrana basal glomerular e depositados na matriz mesangial. CAA foi visto em quantidades consideravelmente menores do que CCA, isto se atribuindo ao fato de que CAA, mas não CCA, é repellido pela carga negativa da membrana basal glomerular (BARSOUM, 1987).

Outros fatores importantes, além da produção de antígenos pelo verme adulto, parecem contribuir na gênese da doença glomerular na esquistossomose mansônica, como a circulação colateral do sistema porta em decorrência do grau de envolvimento hepático, a ineficiência do sistema macrofágico do fígado, a severidade e a duração da infestação e, ainda, fatores raciais e genéticos (BARSOUM, 1987; RODRIGUES et al., 2010). A hipertensão porta, com circulação colateral, facilita a passagem dos antígenos esquistossomóticos que se ligam aos anticorpos na circulação e posteriormente se depositam nos glomérulos (DIGEON et al., 1979).

Também é sugerida a participação da Imunoglobulina A (IgA) como mediadora de lesões glomerulares em estádios mais avançados da doença, porém a relevância destes dados ainda é discutível. Acredita-se que a hipertensão portal e o dano hepático com ineficiência do sistema macrofágico hepático desempenham papel fundamental, permitindo que tanto os antígenos esquistossomóticos quanto os

polímeros de IgA escapem da depuração hepática (DIGEON et al., 1979; BARSOUM, 1987).

A lesão glomerular também se relaciona com a intensidade da parasitose e o tipo e duração do processo. Ensaio com ratos infectados com quantidades diferentes de cercárias evidenciaram proteinúria significativa, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia naqueles infectados com 50 cercárias ou mais, mas não nos controles ou no grupo infectado com 20 cercárias, parecendo haver correlação significativa entre as alterações patológicas e a duração e carga de infecção por *S. mansoni* (SOBH et al., 1991).

Classicamente, a glomerulopatia esquistossomótica é associada à forma hepatoesplênica da esquistossomose, no entanto, também é observada na sua forma hepatointestinal (SOBH et al., 1988; ABENSUR et al., 1992). Em geral, os pacientes são adultos jovens, de ambos os sexos, residentes em áreas endêmicas da doença (ANDRADE; VAN MARCK, 1984). Podem apresentar-se ao exame físico com hepatomegalia com proeminência do lobo esquerdo e, na maioria das vezes, esplenomegalia (ANDRADE; ROCHA, 1979).

A apresentação clínica da glomerulopatia esquistossomótica é variável, sendo a síndrome nefrótica a forma clínica de apresentação mais frequente (ANDRADE; VAN MARCK, 1984). Uma peculiaridade é o fato de cursar com níveis normais de colesterol em 33% dos casos e hiperglobulinemia em 26%. A proteinúria é de baixa seletividade (MARTINELLI; ROCHA, 1996). Além da síndrome nefrótica, outras manifestações da nefropatia esquistossomótica incluem hipocomplementemia, microalbuminúria ou proteinúria não nefrótica. Hipertensão arterial sistêmica está presente em 15 a 40% dos pacientes, e doença renal crônica, à avaliação inicial, pode ser documentada em um número variável de pacientes (SOBH et al., 1987).

É descrita também a associação de envolvimento glomerular em pacientes com esquistossomose mansônica e salmonelose septicêmica prolongada, no entanto, a natureza desta relação ainda não é clara (LAMBERTUCCI et al., 1987).

O quadro histológico da glomerulopatia esquistossomótica é variável, a depender da presença ou ausência de manifestações clínicas, e também parece receber influência de fatores geográficos (QUEIROZ et al., 1973; ANDRADE; ROCHA, 1979; BARSOU, 1987; ABENSUR et al., 1992). O tipo histológico mais frequentemente descrito é a glomerulonefrite membranoproliferativa, geralmente com síndrome nefrótica (ANDRADE; VAN MARCK, 1984; ANDRADE; VAN MARCK, 1987; RODRIGUES et al., 2010). Estudo brasileiro recente, porém, encontrou como padrão predominante na esquistossomose a glomeruloesclerose segmentar e focal (DOS SANTOS et al., 2011).

Os antígenos do verme adulto do *S. mansoni* depositam-se nos glomérulos, levando ao reconhecimento de cinco classes de glomerulopatia. A classe I, glomerulonefrite mesangioproliferativa está associada à deposição de complexos imunes, contendo antígenos esquistossomóticos, IgM e C3. A classe II, glomerulonefrite exsudativa, é caracterizada por neutrófilos, monócitos e eosinófilos, invadindo o mesângio, além de depósitos subendotelial e mesangial de C3, muitas vezes associados com IgG e IgM. Ocorre concomitante com infecção pelo *Schistosoma* e espécies de salmonela. A classe III é uma glomerulonefrite membranoproliferativa, enquanto a classe IV é uma lesão esclerosante segmentar e focal. Estas duas classes constituem a maioria dos pacientes com doença progressiva e se correlacionam com o grau de fibrose hepática esquistossomótica associada. São muitas vezes associadas com anormalidades em componentes séricos de IgA, bem como depósitos de IgA glomerular e peritubular. A classe V, amiloidose, decorre de uma resposta generalizada à inflamação crônica e ocorre nos casos de infecção prolongada (BARSOU, 2004).

Acredita-se que os padrões de lesão glomerular descritos na esquistossomose reflitam a influência de fatores geográficos, e talvez diferenças patogênicas. Amiloidose, por exemplo, raramente é vista no meio local como complicação de glomerulopatia esquistossomótica avançada, assim como os depósitos glomerulares de IgA observados em séries africanas (BRITO, 1999; NUSSENZVEIG et al., 2002).

Utilizando-se de anticorpos monoclonais, antígeno de vermes adultos e antígeno solúvel de ovo podem ser localizados ultraestruturalmente por

imunomicroscopia nos glomérulos de hamsters infectados com cercárias ou injetados com ovos de *Schistosoma mansoni*. Antígenos de vermes adultos são observados, principalmente no citoplasma de células mesangiais, matriz mesangial e membrana basal glomerular, ou como partículas de ouro isoladas ou em pequenos depósitos elétron-densos de origem imune provável (DE BRITO et al., 1998).

2.4.2 Alterações tubulares na esquistossomose

Ao contrário do que acontece com a glomerulopatia esquistossomótica, o envolvimento tubular na esquistossomose tem sido pouco descrito na literatura. Duarte et al (2014) mostraram que pacientes com EHE com filtração glomerular preservada, semelhante ao que acontece em outras doenças infecciosas como leishmaniose tegumentar americana, calazar e hanseníase (LIMA VERDE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012), apresentam uma incidência elevada de alterações tubulares, com incapacidade de concentração urinária presente em 85% dos casos e déficit de acidificação urinária em 45%. A osmolaridade urinária e os valores da relação entre osmolaridade urinária e plasmática (U/P_{osm}) foram significativamente menores nos pacientes com EHE em comparação com os controles, e, o pH urinário, por sua vez, foi significativamente maior nos pacientes com EHE, em comparação com os controles, sugerindo acidose tubular renal distal (DUARTE et al., 2014).

Duarte et al (2014) avaliaram também o manejo renal de sódio por meio da fração de excreção de sódio (FE_{Na}), não sendo encontrada diferença nos níveis de FE_{Na} entre os pacientes com esquistossomose mansônica e o grupo-controle. Foram evidenciados menores níveis de reabsorção de água livre de solutos (TcH_2O) entre os pacientes com EHE indicando déficit na reabsorção de água, o que está associado com o déficit de concentração urinária. O mecanismo pelo qual os pacientes com EHE exibem déficit de concentração urinária e acidificação urinária não está claro, mas pode também estar relacionado a componentes imunológicos ativado pela infecção parasitária (DUARTE et al., 2014).

Até o presente momento, nenhuma alteração histopatológica dos túbulos renais em pacientes infectados com *S. mansoni* foi relatada na literatura. Mais

recentemente, um trabalho experimental com camundongos infectados por cercaria revelou, através de microscopia, alterações morfológicas leves a moderadas das células tubulares em comparação com os controles. Ultraestruturalmente, havia edema com formação de corpos fantasmas (fragmentos citoplasmáticos destacados), atrofia e vacuolização, além da formação de vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias danificadas e grandes materiais eletrodensos em algumas células tubulares (EID et al., 2017).

2.4.3 Lesão Renal Aguda

Lesão renal aguda parece ser uma característica importante da esquistossomose descompensada e está associada com significativa morbidade e mortalidade (DUARTE et al., 2015). No entanto, este tema ainda carece de mais relatos na literatura.

Em um estudo retrospectivo, Duarte et al (2015) avaliaram 60 pacientes portadores de EHE hospitalizados após quadro de descompensação clínica da doença. LRA foi definida de acordo com os critérios de RIFLE (BELLOMO et al., 2004) e estava presente em 43,3% durante a internação hospitalar. Maior média de idade, maior tempo de internação, presença de ascite e uso de diurético foram condições associadas com LRA. Morte ocorreu em cinco casos, sendo quatro no grupo com LRA. As classificações de Child-Pugh e MELD (CHILD; TURCOTTE, 1964; KAMATH et al., 2001), utilizadas para avaliar a gravidade e o prognóstico da doença hepática crônica, apresentaram escores mais altos entre os pacientes com LRA (DUARTE et al., 2015).

No entanto, não estão claros os mecanismos através dos quais a esquistossomose pode levar a disfunção renal aguda, se por mecanismos decorrentes do quadro de insuficiência hepática transitória observado nestes pacientes ou se por algum mecanismo adicional relacionado à infecção crônica (DUARTE et al., 2019).

2.4.4 Biomarcadores de lesão renal

A pesquisa de novos biomarcadores renais é deveras importante, uma vez que pode fornecer o diagnóstico precoce de alterações renais, permitindo a adoção de medidas que possam prevenir a progressão para doença renal crônica terminal. É possível que no futuro, um painel de biomarcadores de lesão renal seja utilizado na prática médica, para detectar lesões subclínicas, glomerulares ou tubulares (MENESES et al., 2020).

A creatinina sérica tem sido utilizada como um biomarcador de lesão renal há mais de um século, mas é bem conhecida por ser um marcador de aumento tardio no sangue dos pacientes, elevando-se apenas quando a doença clínica já está estabelecida. Por este motivo, nos últimos anos, houve um aumento exponencial na investigação de novos biomarcadores renais que fossem mais precoces e específicos para o dano renal (MCCULLOUGH et al., 2013). Dentre estes marcadores, os mais estudados são a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), molécula de injúria renal-1 (KIM-1), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), cistatina C, fator nuclear kappa B (NF- κ B), microalbuminúria e proteínas de membrana presentes em exossomas urinários (DUARTE et al., 2020; MENESES et al., 2020).

2.4.4.1 Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), uma quimiocina que atua como potente ativador de monócitos/macrófagos (JIANG et al., 1992), é sugerida como um biomarcador precoce de dano renal e parece desempenhar papel importante na patogênese da lesão renal progressiva e em variados tipos de doenças renais, com base em observações de vários modelos animais e humanos (SEGERER et al., 2000).

Hanemann et al (2013) avaliaram pela primeira vez os níveis urinários de MCP-1 na esquistossomose, encontrando um aumento significativo deste biomarcador na urina de pacientes com esquistossomose mansônica ativa e tratada, em comparação com o grupo-controle, além de correlação dos níveis de MCP-1

urinário com microalbuminúria. Mesmo sem ter sido observada diferença entre os grupos em relação à taxa de excreção urinária de albumina, um aumento de MCP-1 urinário foi observado em pacientes com infecção ativa ou tratada pelo *S. mansoni*, sugerindo que a infecção pode induzir um estado de inflamação renal crônico não interrompido pelo tratamento específico do agente agressor.

Duarte et al (2014) encontraram níveis maiores de MCP-1 urinário nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica compensada comparado a um grupo-controle de indivíduos saudáveis. Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de MCP-1 e os de microalbuminúria e proteinúria de 24 horas nos pacientes com esquistossomose. O achado de diferença nos níveis de MCP-1, mas não nos níveis de microalbuminúria e proteinúria na comparação do grupo com esquistossomose e o grupo-controle, pode sugerir um papel do MCP-1 na detecção mais precoce de dano renal associado à esquistossomose.

2.4.4.2 Exossomas Urinários

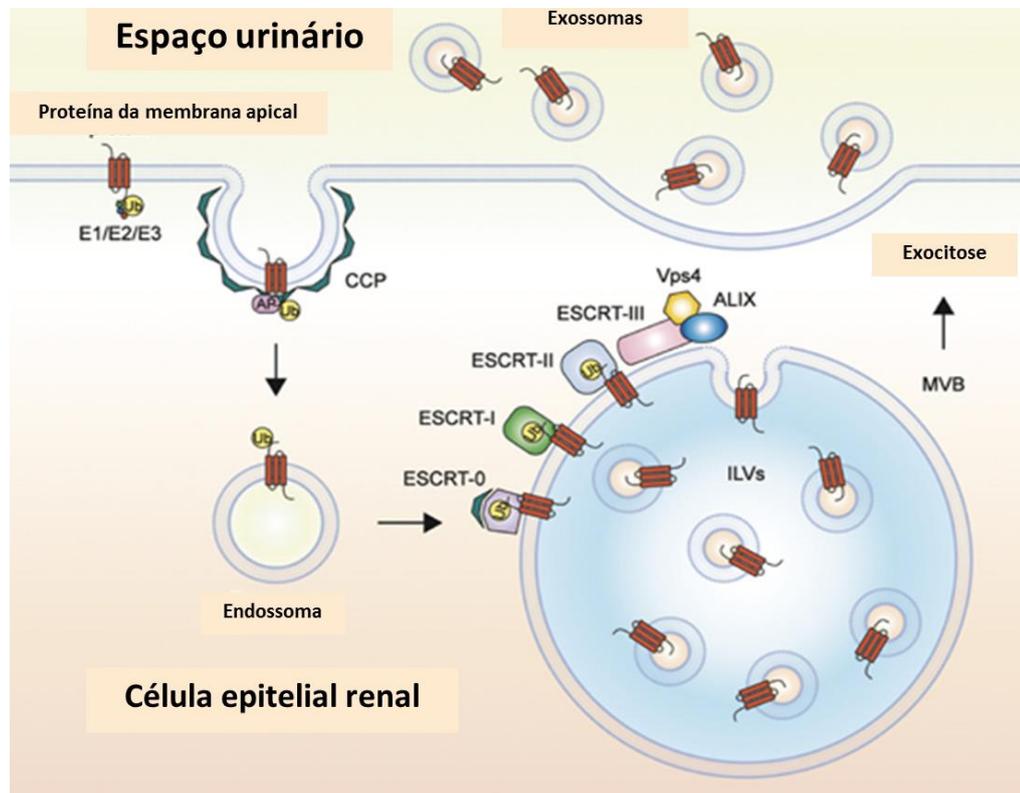
Uma forma de melhor compreender as alterações glomerulares e principalmente tubulares na esquistossomose mansônica seria através da identificação dos exossomas urinários. Os exossomas foram descritos pela primeira vez por Rose Johnstone em 1980. Consistem de nanovesículas (30-100 nm) de origem endocítica que são secretadas no espaço extracelular ou fluidos corporais quando um corpo multivesicular funde-se com a membrana plasmática (DIMOV; VELICKOVIC; STEFANOVIC, 2009). Além da urina, exossomas já foram detectados em vários fluidos biológicos, incluindo plasma, secreção nasal, saliva e leite materno (ADMYRE et al, 2007; PALANISAMY et al, 2010; LÄSSER et al., 2011a, 2011b; VAN BALKON et al., 2011).

O exossoma desenvolve-se no interior da célula quando um segmento da membrana celular sofre endocitose, originando um endossoma precoce. Os endossomas precoces formam pequenas vesículas que irão povoar os corpos multivesiculares ou endossomas tardios, estes, posteriormente irão se fundir com a membrana celular, desencadeando a liberação das vesículas do seu interior para o meio extracelular, momento em que estas vesículas passam a ser chamadas de

exossomas (VAN BALKOM et al., 2011). A figura 3 mostra um esquema de formação dos exossomas e sua liberação na urina.

Os exossomas urinários, assim como os demais, são proteínas de muito baixa densidade que apenas se sedimentam após ultracentrifugação. Análise de urina de indivíduos adultos saudáveis revelou que do total de proteínas excretadas, 48% eram proteínas incluídas no sedimento, 49% eram proteínas solúveis e apenas 3% estavam em exossomas (ZHOU et al., 2006; DIMOV; VELICKOVIC; STEFANOVIC, 2009).

Figura 3 - Esquema da formação de exossomas e liberação na urina



Adaptado de Van Balkon et al., 2011.

Os exossomas urinários diferem na sua composição e origem subcelular, sendo secretados a partir de todos os tipos de células renais como podócitos, células do túbulo contorcido proximal, distal e células epiteliais transicionais, tornando-se assim uma excelente fonte de amostras para o estudo da fisiologia e da patologia renal. O estudo dessas vesículas extracelulares na urina pode ser considerado uma imagem não invasiva do estado fisiológico do sistema renal (PISITKUN; SHEN; KNEPEER, 2004; GAMÉZ-VALERO et al., 2015).

As células epiteliais de cada segmento do nefron podem contribuir para a população de exossomas urinários, incluindo proteínas de membrana, tais como transportadores e receptores, mRNAs e microRNAs e moléculas sinalizadoras que refletem o estado fisiológico de suas células de origem e, conseqüentemente, constituem uma rica fonte de potenciais moléculas biomarcadoras (VAN BALKOM et al., 2011; STREET et al., 2017).

Dentre os transportadores de membrana já estudados através de exossomas estão a aquaporina-2 (AQP-2), o trocador sódio-hidrogênio do tipo 3 (NHE3), o transportador sódio-potássio-2-Cloro (NKCC2), o transportador H⁺ATPase e a pendrina. A AQP2 é uma das proteínas mais estudadas e pode representar um biomarcador diagnóstico de alterações no balanço de água, como por exemplo, nos casos de diabetes insipidus nefrogênico (KANNO et al., 1995; DIMOV; VELICKOVIC; STEFANOVIC, 2009). O NHE3 é encontrado no túbulo proximal sendo o ator principal na geração e reabsorção de bicarbonato. H⁺ATPase e pendrina, por sua vez, são transportadores envolvidos no controle acidobásico presentes no nefron distal (OLIVEIRA et al., 2011). O NKCC2 é encontrado na membrana luminal do ramo ascendente espesso da alça de Henle e é um elemento importante nos mecanismos de concentração e diluição urinária (ANDRADE et al., 2007).

Na literatura médica vigente não há estudos que demonstrem alterações em exossomas urinários em pacientes portadores de esquistossomose.

2.5 Tratamento e evolução

O tratamento com antiparasitários, como oxamniquina ou praziquantel, está indicado em todos os casos em que há evidência de doença ativa, salvo contra-indicações. Apresenta benefícios, como melhora dos sintomas, sensação de bem-estar, redução do tamanho do fígado e do baço, diminuição da fibrose hepática (GRYSEELS et al., 2006; MAGUIRE, 2010).

O praziquantel é apresentado em comprimidos de 600 mg e administrado por via oral, em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças. Para a oxamniquina, as doses recomendadas são de 20 mg/kg

para crianças e de 15 mg/kg para adultos. Ambas as medicações devem ser tomadas de uma só vez, cerca de uma hora após a refeição (BRASIL, 2014).

O tratamento da esquistossomose aguda grave deve ser iniciado com prednisona (1mg/kg de peso/dia) seguido pelo antiparasitário (oxamniquina ou praziquantel) 24 a 48 horas depois. No concernente à hipertensão portal, o tratamento cirúrgico é empregado nos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos que cursam com hemorragia digestiva alta, sendo a esplenectomia associada à ligadura da veia gástrica esquerda ou a desconexão ázigo-portal com esplenectomia as técnicas mais utilizadas (DOMINGUES; NOVAIS, 2004; BRASIL, 2014).

Quanto ao acometimento renal, alguns estudos sugerem que as lesões renais são irreversíveis, porque muitos casos têm atraso no diagnóstico. Tratamento antiparasitário específico, no entanto, pode alterar o desenvolvimento da doença renal ou sua progressão quando instituído nas fases iniciais. Pacientes com formas proliferativas não respondem ao tratamento antiparasitário nem à imunossupressão, sugerindo que este tipo de envolvimento glomerular tem um padrão progressivo (MARTINELLI; ROCHA, 1996).

Uma vez deflagrado o quadro clínico, a glomerulopatia já é avançada, irreversível, em um estágio no qual os mecanismos não imunológicos de progressão da doença renal já estão ativados e independem da presença ou ausência do parasita. É possível que o tratamento antiparasitário nas fases iniciais da doença, em pacientes ainda sem manifestações clínicas de doença renal, possa alterar o desenvolvimento ou a progressão da nefropatia (OTT et al., 1983; MARTINELLI; PEREIRA, 1987; SOBH et al., 1987; SOBH et al., 1988).

A evolução dos pacientes com glomerulosclerose segmentar focal secundária à esquistossomose é semelhante à forma idiopática, com evolução para doença renal crônica em cerca de 60% dos casos (MARTINELLI et al., 1995). No Egito, cerca de 10% dos pacientes em hemodiálise crônica têm como causa da doença renal a esquistossomose (BARSOU, 1993, 2004). Estudo retrospectivo recente com um longo tempo de seguimento (59,7 meses) avaliou 24 pacientes com glomerulopatia esquistossomótica e mostrou que um terço deles,

independentemente de sua forma histológica, progride para a diálise. A creatinina sérica basal foi maior entre os pacientes que desenvolveram DRCT do que entre aqueles que não desenvolveram (NEVES et al., 2020).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar, através do isolamento de exossomas urinários, a expressão dos transportadores urinários AQP2, NKCC2 e NHE3 em pacientes portadores de EHE compensada.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar alterações da função renal em nível glomerular e/ou tubular;
- Correlacionar a expressão dos exossomas urinários com o quadro laboratorial do paciente;
- Correlacionar a expressão dos exossomas urinários com as alterações de acidificação urinária apresentadas pelos pacientes;
- Correlacionar a expressão dos exossomas urinários com as alterações de concentração urinária apresentadas pelos pacientes;
- Correlacionar a expressão dos exossomas urinários com os níveis de microalbuminúria, proteinúria e MCP-1 dos pacientes.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo transversal de pacientes com a forma hepatoesplênica compensada da esquistossomose mansônica, acompanhados no ambulatório de Hepatologia do Hospital Professor Alberto Antunes (HUPAA) da Universidade Federal de Alagoas. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (processo nº 004228/2011-81).

4.2 Caracterização do local do estudo

Foram estudados pacientes com diagnóstico confirmado de EHE acompanhados no ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas, na cidade de Maceió-AL.

4.3 Critérios de inclusão

- Pacientes de ambos os gêneros, com idade de 18 a 65 anos.
- Diagnóstico confirmado da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica.
- Assinatura do Termo de Consentimento Informado, após esclarecimentos pertinentes aos testes de função renal.

4.4 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnóstico de diabetes *mellitus*.
- Pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg e/ou uso de anti-hipertensivos).

- Pacientes portadores de insuficiência cardíaca.
- Pacientes com história de doença renal prévia (aguda ou crônica, TFG < 60 mL/min), nefrolitíase, história de infecção urinária de repetição e uso de drogas nefrotóxicas.
- Pacientes portadores de doenças hepáticas de outra etiologia, como hepatites virais ou alcoolismo.
- Pacientes com a forma hepatoesplênica descompensada, com história de sangramento digestivo recente (menos de seis meses) e/ou ascite volumosa com necessidade de uso de diurético.

4.5 Protocolo do diagnóstico

- Diagnóstico etiológico de esquistossomose mansônica comprovado pelo exame parasitológico de fezes positivo (realizado mediante a pesquisa de ovos de *S. mansoni* nas fezes por métodos qualitativos ou quantitativos) e/ou biopsia de reto positiva e/ou biopsia hepática positiva.
- Diagnóstico clínico de EHE, corroborado pela presença de hepatomegalia e/ou esplenomegalia no exame físico, achados ultrassonográficos de hepatoesplenomegalia, fibrose periportal ou aumento do calibre da veia porta, história de sangramento digestivo, presença de varizes de esôfago na endoscopia digestiva alta e/ou passado de esplenectomia.
- Diagnóstico epidemiológico.

4.6 Primeira fase do estudo

Na primeira fase do estudo, realizada em 2013, foram entrevistados 53 pacientes com diagnóstico de EHE, sendo excluídos 33, restando, portanto, 20 sujeitos que aceitaram participar (figura 4) e foram comparados a um grupo-controle constituído de 17 pessoas sadias, doadoras de sangue. Nesta primeira fase, foram

coletadas as características clínicas dos pacientes (identificação, tempo de doença, sinais e sintomas, pressão arterial sistólica e diastólica, peso, estatura, índice de massa corporal); realizada uma avaliação laboratorial geral: hemograma, glicemia de jejum, ureia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e cloro plasmáticos, gasometria venosa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubinas totais e frações, fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina, globulinas, tempo e atividade de protrombina e dosagem de complemento sérico (C3 e C4); calculados parâmetros de avaliação da função renal: taxa de filtração glomerular (TFG) medida em urina de 24 horas; proteinúria e microalbuminúria em amostra de urina de 24 horas; frações de excreção de sódio (FE_{Na}), potássio (FE_K) e magnésio (FE_{Mg}); gradiente de transporte transtubular de potássio (TTKG); relação da osmolaridade urinária e plasmática; transporte de água livre de solutos (TcH_2O); A primeira amostra de urina (T0) foi utilizada para sedimentoscopia e dosagem do biomarcador MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1); foram realizados testes de acidificação (através de sobrecarga ácida com cloreto de cálcio) e concentração urinária (após período de 12h de privação de água e administração de desmopressina - DDAVP[®] spray nasal) conforme protocolos descritos em estudos prévios (DUARTE, 2014).

4.7 Segunda fase do estudo

Avaliação dos exossomas urinários:

As amostras de urina coletadas na primeira fase do estudo foram armazenadas com inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail - ref: P8340, Merck[®]) a uma concentração de 10 μ L / mL de urina, congeladas em freezer a uma temperatura de - 80° C para posteriormente serem transportadas em gelo seco para o Laboratório de Farmácia da Universidade Federal do Ceará onde foi realizada a identificação dos exossomas urinários. O volume de urina mínimo aceito para análise foi de 20 mL. As amostras foram submetidas a extenso vórtice e então centrifugadas a 17.000 g por 15 min a 4°C para remover células inteiras, grandes fragmentos de membrana e outros detritos. O sobrenadante foi submetido a

ultracentrifugação a 200.000 g por 1 h a 4°C para obtenção do pellet de exossomas. Os exossomas foram suspensos em solução de isolamento (200 mmol / L de manitol, 80 mmol / L de HEPES e 41 mmol / L de KOH, pH 7,5) (GONZALES et al., 2019). Todas as amostras de exossomas foram armazenadas a - 80 ° C até o uso.

A recuperação de proteínas associadas aos exossomas urinários é melhorada pela adição de inibidores de protease logo após a coleta da urina e armazenamento a - 80°C. Os inibidores de protease impedem a degradação das proteínas associadas ao exossomas, permitindo um maior tempo de armazenamento da amostra (ZHOU et al., 2006).

Após o isolamento, as proteínas foram quantificadas por *Western Blot*. As quantidades de carga para eletroforese em gel foram ajustadas de acordo com a concentração de creatinina na urina. Bandas correspondentes à expressão proteica dos co-transportadores AQP2 [Novus Biologicals, Chicago, EUA- NB110-74682], NKCC2 [Novus Biologicals, Chicago, EUA- NBP1-57622] e NHE3 (Novus Biologicals, Chicago, USA - NBP1-46581) foram avaliadas e quantificadas usando o sistema Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA). A expressão da proteína foi comparada a controles saudáveis.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram digitados em planilha no programa Microsoft Excel 2010 e posteriormente transportados para análises por meio do programa SPSS para Windows versão 16.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Os Testes de Qui-quadrado, de Pearson, Razão de Verossimilhança e o Teste Exato de Fisher foram aplicados para testes de associação e homogeneidade na distribuição dos dados categorizados. Para verificar a normalidade da distribuição das variáveis contínuas, foi utilizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov.

O Teste Levene foi empregado para comparação de variabilidades. Na condição de normalidade dos dados, a comparação entre duas médias foi feita pelo Teste t-Student. No caso de não normalidade dos dados, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney. O Teste de Correlação de Pearson foi empregado para comparar

duas variáveis numéricas. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($P < 0,05$).

Os resultados foram expressos em tabelas e médias (média \pm DP), no caso de variáveis quantitativas e porcentagens nas variáveis categóricas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e epidemiológicas da população estudada

Das 20 amostras de urina armazenadas, 3 foram excluídas da análise devido ao volume insuficiente de urina e 17 pacientes com EHE tiveram exossomas isolados (figura 4). Nova análise estatística foi realizada comparando as características clínicas, epidemiológicas e os dados laboratoriais de avaliação da função renal dos 17 pacientes com exossomas isolados a um grupo de 9 controles saudáveis, doadores de sangue. A média de idade dos pacientes foi de $42,4 \pm 9,3$ anos (variando de 32 a 57 anos), sendo 9 (53%) do gênero feminino. Não houve diferença significativa entre os pacientes com EHE e o grupo controle com relação a idade, gênero, pressão arterial e índice de massa corpórea (Tabela 1).

Figura 4 - Distribuição dos pacientes portadores de esquistossomose entrevistados e motivos de exclusão nas duas fases do estudo

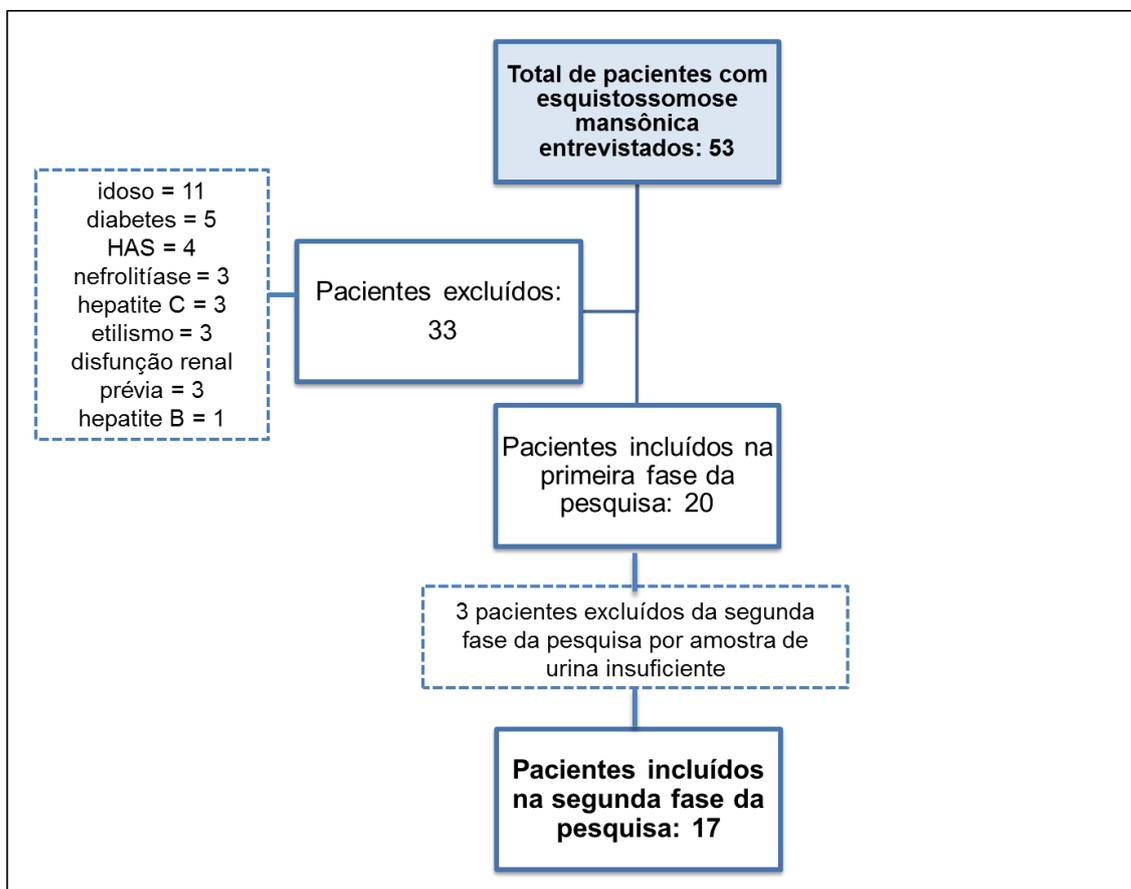


Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com EHE e do grupo-controle

Parâmetros	Esquistossomose mansônica (n=17)	Controle (n=9)	P
Idade, anos	42,4 ± 9,3	38 ± 13,1	0,33
Gênero			
Masculino	8 (47%)	5 (55,6%)	1,0
Feminino	9 (53%)	4 (44,4%)	
PAS, mmHg	117 ± 18	126 ± 8,9	0,32
PAD, mmHg	74 ± 10	80 ± 7,1	0,24
IMC, kg/m ²	26,3 ± 4,8	26,2 ± 3,8	0,98
Tempo de diagnóstico, anos	17 ± 12	-----	-----

PAS – Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpórea. Dados expressos como média ± desvio-padrão ou números absolutos e porcentagens. Significativo $P < 0,05$ vs. controle pelo Teste t de Student e Fisher.

O tempo médio do diagnóstico da doença foi de 17 ± 12 anos. História pregressa de exame parasitológico de fezes (EPF) positivo para *Schistosoma mansoni* foi obtida de 14 (82%) pacientes. Cinco pacientes (29%) tinham diagnóstico por biopsia hepática. Tratamento antiparasitário prévio foi identificado em 16 (94%) pacientes. Todos eles apresentavam esplenomegalia, sendo que 11 (65%) já haviam sido submetidos à cirurgia de esplenectomia num período de $10 \pm 9,5$ anos. Hepatomegalia, no entanto, estava presente em apenas quatro pacientes (23%), porém todos tinham evidência de fibrose periportal ao exame ultrassonográfico. Sintomas intestinais, como cólicas, diarreia e/ou constipação, foram encontrados em seis (35%) pacientes. Varizes esofágicas evidenciadas em exame endoscópico estavam presentes em 94% dos pacientes, sendo que 65% deles já haviam apresentado algum episódio de sangramento digestivo (Tabela 2).

Tabela 2 - Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento dos pacientes com EHE

	N	%
Esplenomegalia	17	100
Esplenectomia	11	65
Fibrose periportal	20	100
Varizes de esôfago	16	94
Sangramento digestivo prévio	11	65
Sintomas intestinais	6	35
Hepatomegalia	4	23
EPF positivo prévio	14	82
Biopsia hepática positiva	5	29
Tratamento antiparasitário prévio	16	94

EPF – exame parasitológico de fezes

A tabela 3 mostra a comparação dos parâmetros de função renal entre os pacientes com EHE e o grupo controle. A taxa de filtração glomerular (TFG) permaneceu maior no grupo com esquistossomose do que no grupo-controle (131 ± 41 vs. 101 ± 17 mL/min/1,73m², $P=0,04$). A creatinina plasmática foi menor no grupo com EHE do que no grupo controle ($0,63 \pm 0,15$ vs. $0,88 \pm 0,18$, $P=0,001$). Os valores de MCP-1 foram mais elevados no grupo com esquistossomose do que no grupo-controle (145 ± 94 vs. $26,7 \pm 12,7$ pg/mgCr, $P=0,01$). Em condições basais, não houve diferença entre o grupo com EHE e o grupo-controle quanto à ureia plasmática, microalbuminúria, proteinúria, fração de excreção de sódio (FE_{Na}), fração de excreção de potássio (FE_K), fração de excreção de magnésio (FE_{Mg}) e osmolaridade plasmática. Também não houve diferença quanto ao transporte transtubular de potássio (TTKG) e os níveis de reabsorção de água livre de solutos (TcH_2O). A avaliação da capacidade de concentração máxima de urina evidenciou o fato de que os pacientes com EHE exibiam níveis de osmolaridade urinária (U_{osm}) mais baixos do que o grupo-controle após período de 12 horas de privação hídrica (527 ± 155 vs. 792 ± 186 mOsm/Kg, $P < 0,001$), bem como níveis mais baixos nos valores da relação entre osmolaridade urinária e plasmática (U_{osm}/P_{osm}). Déficit de concentração urinária foi encontrado em 82% dos casos e déficit de acidificação urinária em 47%. O pH urinário (U_{pH}) foi maior entre os pacientes com EHE ($6,2 \pm$

0,6 vs. $5,6 \pm 0,5$, $P=0,003$) e os níveis de bicarbonato sérico (HCO_3) foram menores ($23 \pm 1,8$ vs. $27 \pm 3,4$, $P=0,02$). O pH venoso foi semelhante nos dois grupos.

Na avaliação dos exossomas urinários, a expressão da proteína urinária dos canais de água do ducto coletor, AQP2, foi significativamente mais baixa nos pacientes esquistossomóticos que nos controles ($46,8 \pm 40,7$ vs $100 \pm 70,2\%$, $P=0,03$) (figura 5). Por outro lado, como mostrado na figura 6, a expressão do co-transportador NKCC2 foi significativamente mais alta nos pacientes que nos controles ($191,7 \pm 248,6$ vs $100 \pm 43,6\%$, $P=0,01$). Não houve marcação do transportador NHE3.

Nas análises de correlação, os níveis de AQP2 correlacionaram-se positivamente com a osmolaridade urinária e negativamente com o pH urinário (figuras 7 e 8). Por sua vez, os valores de NKCC2 se correlacionaram positivamente com a fração de excreção de potássio (FEK) e com o pH urinário (figuras 9 e 10). Não houve correlação entre AQP2 e NKCC2 com os outros parâmetros laboratoriais.

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros de função renal entre os pacientes com EHE e o grupo-controle

Parâmetros	EHE (N=17)	Controles (N=9)	P
P_{Ur} , mg/dL	23,4 ± 7,4	25,9 ± 6,2	0,48
P_{Cr} , mg/dL	0,63 ± 0,15	0,88 ± 0,18	0,001
TFG, mL/min/1.73m ²	131 ± 41	101 ± 17	0,04
Microalbuminúria, mg/dia	22,9 ± 47,5	4,7 ± 5,5	0,29
Proteinúria, mg/dia	127,5 ± 93	104,7 ± 62,8	0,34
MCP-1 urinário, pg/mgCr	145 ± 94	26,7 ± 12,7	0,01
FE _{Na} , %	0,72 ± 0,3	0,72 ± 0,2	0,98
FE _{Mg} , %	3,17 ± 1,9	2,18 ± 1,6	0,42
FE _K , %	5,4 ± 0,3	4,9 ± 3,2	0,67
P_{Osm} mOsm/KgH ₂ O	288 ± 7,4	285 ± 4,4	0,28
U_{osm} , mOsm/kg	527 ± 155	792 ± 186	< 0,001
U_{osm}/P_{osm}	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,5	< 0,001
TTKG	3,4 ± 1,8	3,0 ± 0,7	0,43
TcH ₂ O, L/dia	0,8 ± 0,5	1,2 ± 0,3	0,16
pH venoso	7,35 ± 0,03	7,35 ± 0,05	0,65
HCO ₃ , mEq/L	23 ± 1,8	27 ± 3,4	0,02
U_{pH}	6,2 ± 0,6	5,6 ± 0,5	0,003
Défice de concentração urinária, %	82	11	0,001
Défice de acidificação urinária, %	47	0	0,03

P_{Ur} – ureia plasmática, P_{Cr} – creatinina plasmática, TFG – taxa de filtração glomerular, MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1, FE_{Na} – fração de excreção de sódio, FE_{Mg} – fração de excreção de magnésio, FE_K – fração de excreção de potássio, P_{Osm} – osmolaridade plasmática, U_{osm} – osmolaridade urinária, U_{osm}/P_{osm} – relação entre a osmolaridade urinária e plasmática, TTKG – gradiente de transporte transtubular de potássio, TcH₂O – reabsorção de água livre de solutos, HCO₃ – bicarbonato sérico, U_{pH} – pH urinário. Dados expressos em média ± desvio-padrão ou números absolutos e porcentagens. Significativo $P < 0,05$.

Figura 5 - Expressão de aquaporina-2 por western blot em exossomas urinários em pacientes com EHE e controles saudáveis.

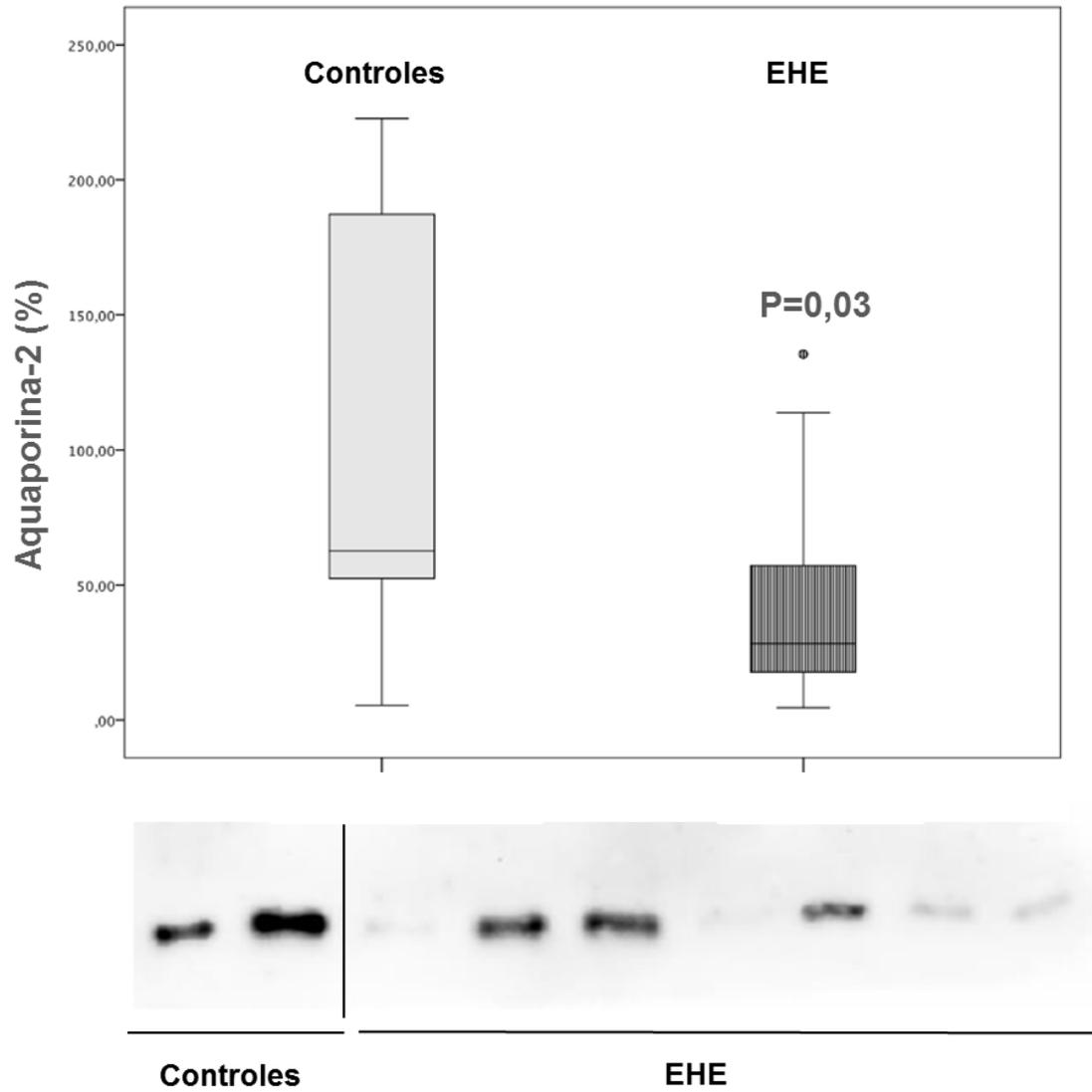


Figura 6 - Expressão de NKCC2 por western blot em exossomas urinários em pacientes com EHE e controles saudáveis.

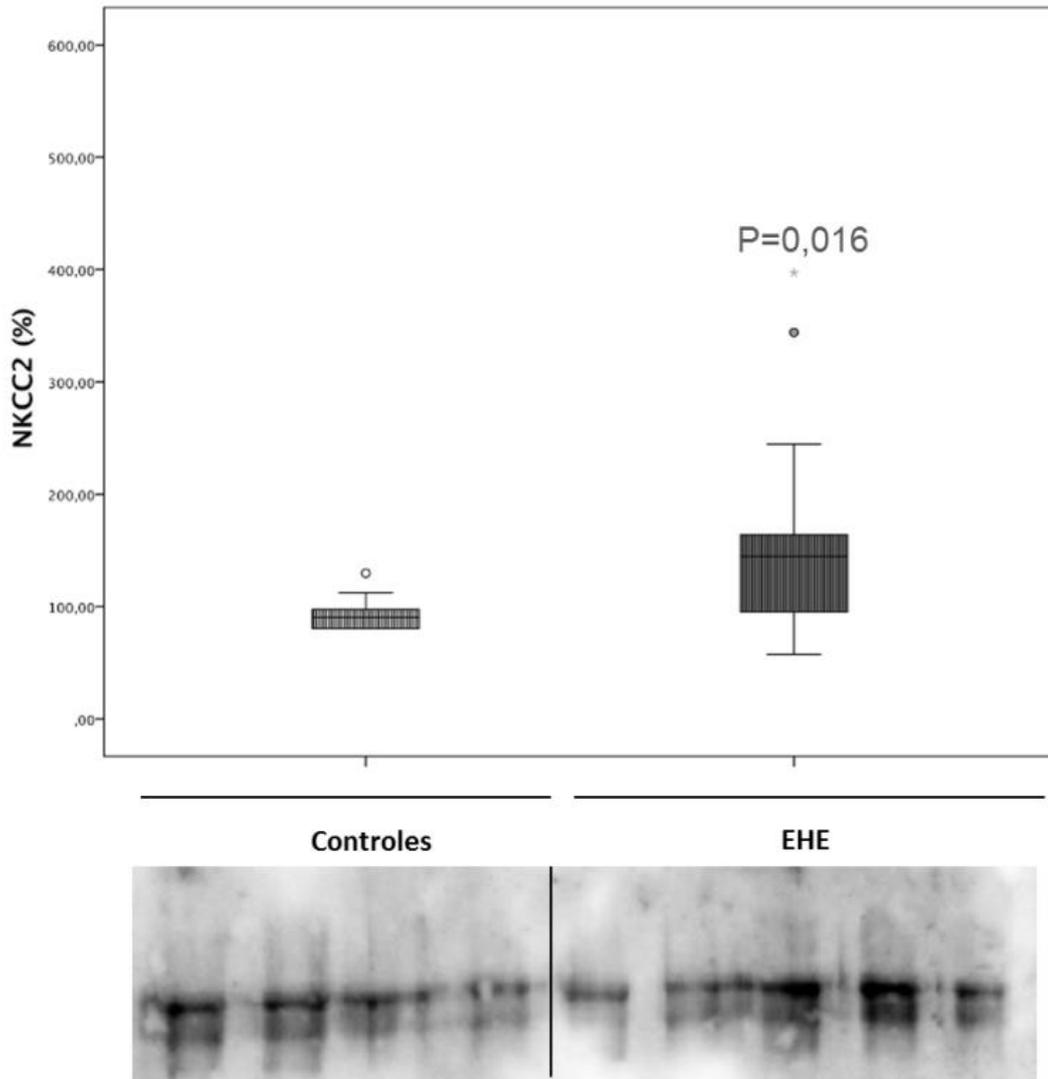


Figura 7 - Correlação aquaporina-2 e osmolaridade urinária entre pacientes com EHE

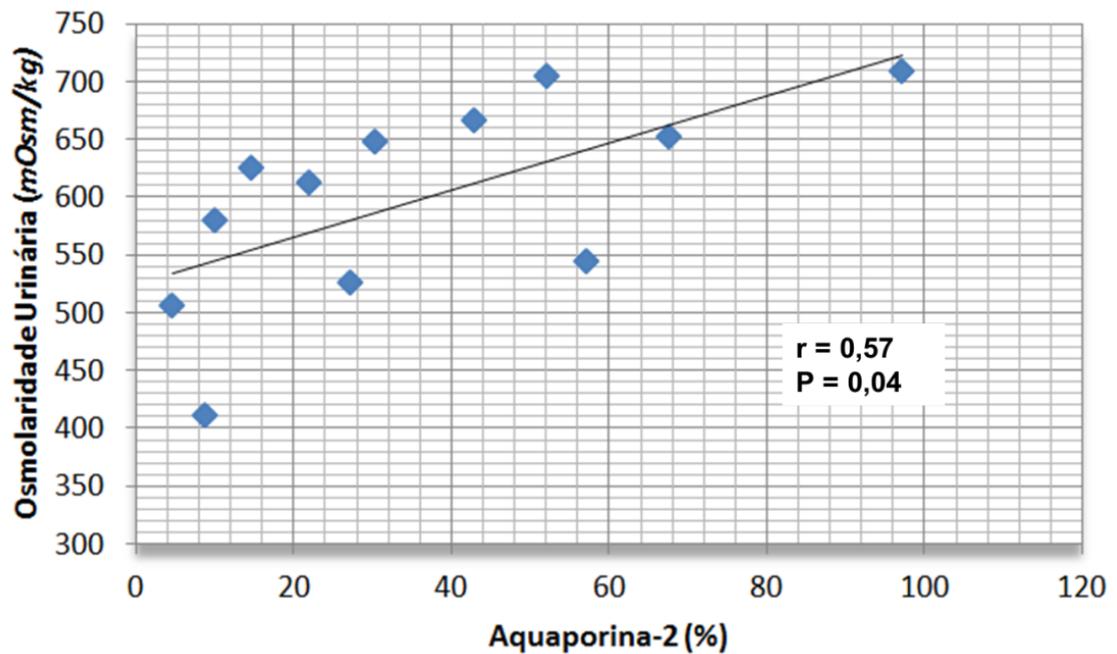


Figura 8 - Correlação aquaporina-2 e pH urinário entre pacientes com EHE

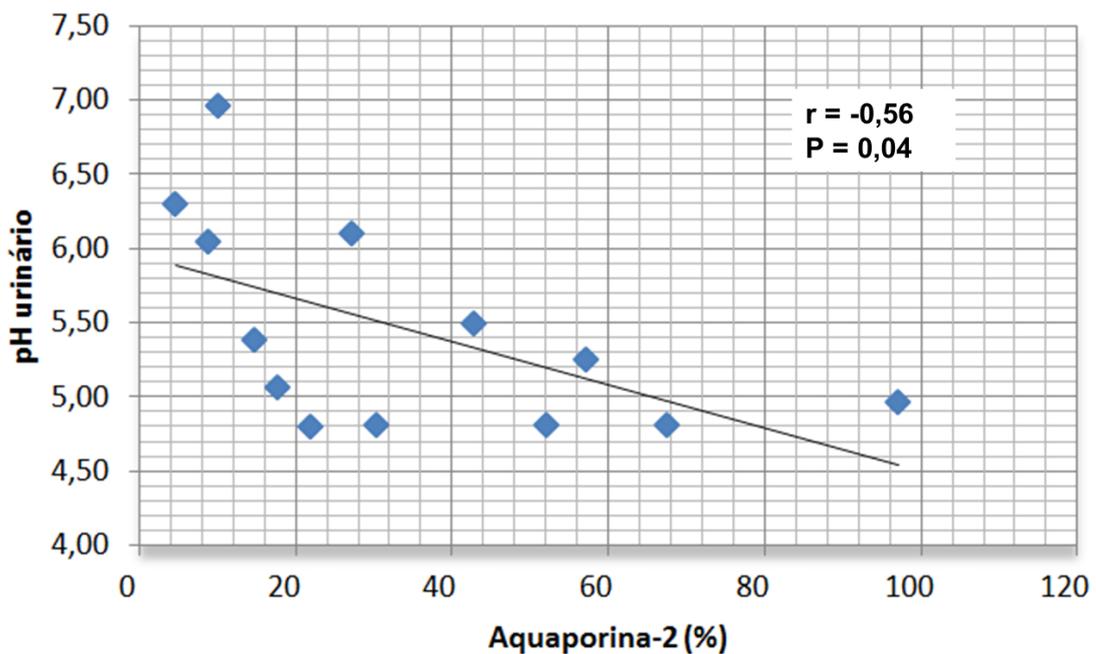


Figura 9 - Correlação NKCC2 e FeK entre pacientes com EHE

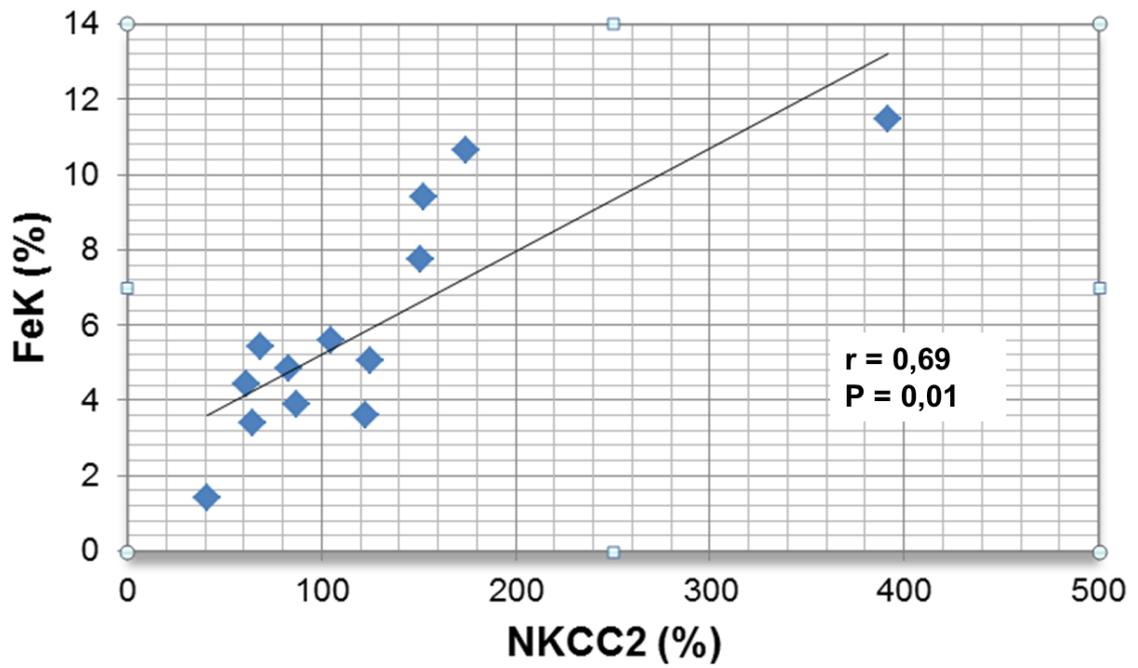
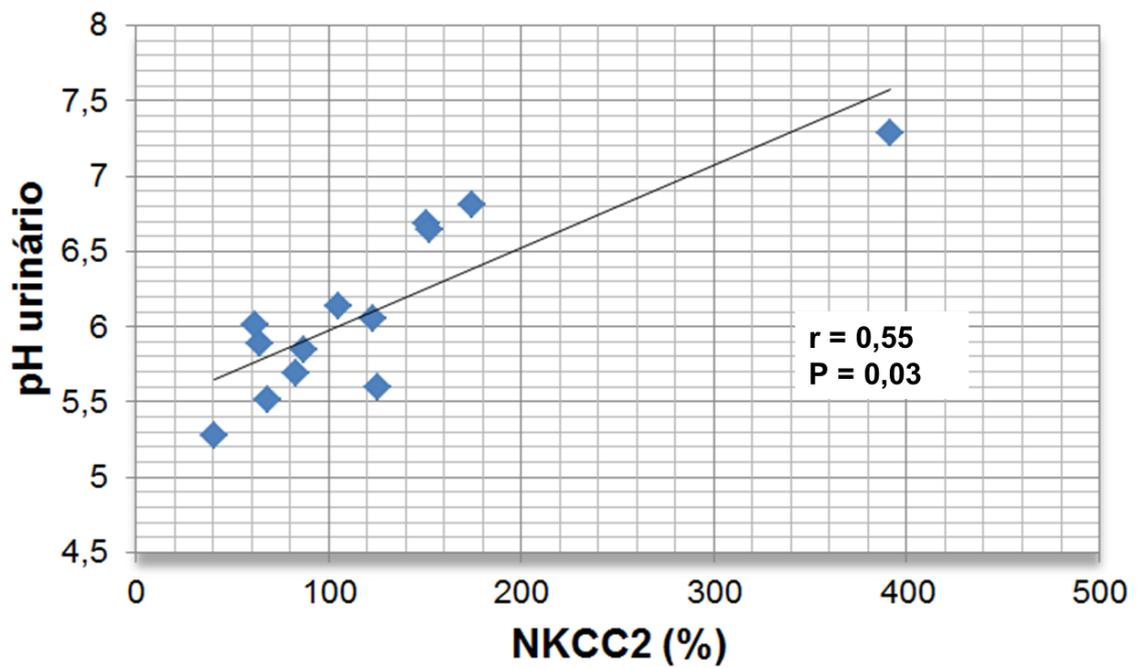


Figura 10 - Correlação NKCC2 e pH urinário entre pacientes com EHE



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que investigou a expressão dos transportadores tubulares através de exossomas urinários na EHE e apresenta importantes aspectos sobre a função tubular renal nesses pacientes. A diminuição da expressão de AQP2 e o aumento da expressão de NKCC2 podem explicar a incapacidade de concentração urinária e defeitos de acidificação urinária em pacientes com EHE, identificados em estudo prévio (DUARTE et al., 2014).

O acometimento renal na esquistossomose começou a ser descrito por intermédio de estudos publicados, principalmente, por pesquisadores brasileiros, nas décadas de 1960 e 1970, e já está bem documentado em ensaios clínicos e experimentais (MARTINELLI; ROCHA, 1996). A prevalência de envolvimento renal na esquistossomose é variável, dependendo da população estudada. Considerando-se todas as formas da doença, a incidência de envolvimento glomerular é estimada em 5% a 6%, e aumenta para 15% na forma hepatoesplênica (BRITO, 1999). Apesar do envolvimento glomerular estar bem documentado, relatos acerca da função tubular em pacientes esquistossomóticos são escassos na literatura e começaram a partir de estudos do nosso grupo.

Anteriormente, foi demonstrado pela primeira vez, nessa mesma amostra de pacientes que a EHE pode causar disfunção tubular assintomática, sem diminuir a taxa de filtração glomerular (DUARTE, 2014). No presente estudo, os novos dados mostram uma diminuição na expressão de AQP2 que justifica o achado de déficit de concentração urinária em 82% dos casos estudados. Adicionalmente, a expressão de AQP2 se correlacionou positivamente com os valores de osmolaridade urinária dos pacientes. A AQP2, expressa na membrana plasmática apical do ducto coletor, é a aquaporina mais estudada no rim que depende da ação do hormônio antidiurético (ADH) (ROJEK et al., 2006). No seu estado basal, localiza-se sobretudo em vesículas intracelulares. Com o estímulo do ADH, a AQP2 é translocada do compartimento intracelular para a membrana apical por fusão endocítica. Uma vez a AQP2 estando na membrana apical, a água é facilmente reabsorvida (KOEPPEN; STANTON, 2007; TAKATA et al., 2008). A redução na expressão de AQP2 resulta em um grave defeito de concentração urinária e no aparecimento de diabetes insipidus (ROJEK et al., 2006; TAKATA et al., 2008). A AQP2 encontra-se

desregulada em inúmeras desordens do metabolismo da água, incluindo os distúrbios associados à poliúria (obstrução do trato urinário, hipocalemia, inflamação e toxicidade pelo lítio) e em estados de hiponatremia dilucional, como na síndrome de secreção inapropriada de ADH, insuficiência cardíaca e cirrose (RADIN et al., 2012).

Além disso, no estudo sob relatório, pacientes com EHE também mostraram um aumento acentuado na expressão da proteína urinária NKCC2. O transportador de NKCC2 é encontrado na membrana luminal do ramo ascendente espesso da alça de Henle e é um elemento importante nos mecanismos de concentração e diluição urinária, sendo o principal transportador de reabsorção apical neste segmento do néfron (ANDRADE et al., 2007). Em nosso estudo, a expressão aumentada do NKCC2 deve representar um mecanismo compensatório à redução do AQP2.

Pequeno percentual de pacientes com esquistossomose pode se apresentar com doença renal avançada e cerca de 30% a 40% dos pacientes exibem hipertensão arterial à época do diagnóstico da doença renal (MARTINELLI; ROCHA, 1996). No presente estudo, todos os pacientes tinham pressão arterial normal, critério para inclusão no estudo. Os pacientes apresentaram hiperfiltração glomerular, sendo a taxa de filtração glomerular mais alta no grupo com esquistossomose mansônica, quando comparado com o grupo-controle. A principal consequência em longo prazo da hiperfiltração glomerular é a redução da TFG decorrente da glomerulosclerose.

A prevalência de DRC nos pacientes com esquistossomose mansônica não é clara e varia de acordo com a série estudada. Martinelli et al. (1989), comparando 21 pacientes com EHE e glomerulonefrite mesangiocapilar na biópsia renal com 19 pacientes com a forma idiopática desta glomerulonefrite, num período de seguimento de 48 meses, constataram o caráter progressivo da doença, não influenciada por terapia com antiparasitários ou imunossupressores, exibindo um curso clínico semelhante ao da forma idiopática. Estudo brasileiro recente avaliou retrospectivamente com um longo tempo de seguimento (59,7 meses), 24 pacientes com glomerulopatia esquistossomótica e mostrou que um terço deles, independentemente de sua forma histológica, progride para a diálise (NEVES et al.,

2020). É provável que as alterações tubulares também contribuam para a progressão da nefropatia e evolução para doença renal crônica terminal nos pacientes com EHE. No entanto, dados relacionados a esse tema são escassos e precisam ser melhor esclarecidos (DUARTE et al., 2019).

Com o propósito de superar a limitação dos marcadores clássicos utilizados para avaliação da função renal, houve um aumento exponencial nas pesquisas com novos biomarcadores que fossem mais precoces e específicos para o dano renal (MCCULLOUGH et al., 2013). Essas pesquisas têm o intuito de obter informações importantes a respeito da localização, intensidade, diagnóstico diferencial e capacidade preditora do dano renal, além da possibilidade de também avaliar os impactos da adoção de medidas que possam prevenir a progressão para doença renal crônica terminal (KASHANI; CHEUNG PASITPORN; RONCO, 2017).

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), uma quimiocina que atua como potente ativador de monócitos/macrófagos (JIANG et al., 1992), é sugerida como um desses novos biomarcadores e parece desempenhar papel importante na patogênese da lesão renal progressiva e em variados tipos de doenças renais, com base em observações de vários modelos animais e humanos (SEGERER et al., 2000). MCP-1 urinário foi associada à piora da albuminúria em pacientes com nefropatia diabética (BANBA et al., 2000; AMANN, TINZMANN E ANGETKORT, 2003) e também em pacientes com glomerulopatia primária e secundária (DANTAS et al., 2007). Da mesma forma, MCP-1 urinário é correlacionado à excreção urinária de albumina em outras doenças renais, como na nefrite lúpica e doença renal policística autossômica dominante (BARBADO et al., 2012; MUREA et al., 2012).

A associação entre MCP-1 e esquistossomose foi verificada pela primeira vez por Hanemann et al. (2013), sendo encontrado um aumento significativo dos níveis de MCP-1 urinário em pacientes com esquistossomose mansônica ativa (grupo 1) e tratada (grupo 2), em comparação com o grupo-controle (grupo 3), além de correlação dos níveis de MCP-1 urinário com microalbuminúria. Mesmo sem ter sido observada diferença entre os três grupos em relação à taxa de excreção urinária de albumina, um aumento de MCP-1 urinário foi observado em pacientes com infecção ativa ou tratada pelo *S. mansoni*, sugerindo que a infecção pode

induzir um estado de inflamação renal crônico não interrompido pelo tratamento específico do agente agressor (HANEMANN et al., 2013).

Apesar dos pacientes com EHE deste estudo apresentar níveis urinários de MCP-1 aumentados em relação ao grupo controle e também do achado previamente descrito de correlação positiva deste marcador com albuminúria e proteinúria neste grupo de pacientes (DUARTE, 2014; DUARTE et al., 2014), não houve correlação entre AQP2 e NKCC2, com MCP-1 urinária, albuminúria ou proteinúria. O aumento do MCP-1 urinário sugere a participação de mecanismos inflamatórios relacionados à infecção por *S. mansoni* que poderiam afetar diretamente o tecido renal (HANEMANN et al., 2013; DUARTE et al., 2014). Entretanto, a falta de correlação com os transportadores tubulares pode indicar a participação de outros mecanismos não inflamatórios na patogênese do dano tubular ou mecanismos indiretos relacionados com o processo inflamatório. O papel do MCP-1 na detecção mais precoce de dano renal associado à esquistossomose, portanto, poderia se dar na glomerulopatia esquistossomótica, mas não na tubulopatia.

El-koraie et al. (2002), investigando o papel de marcadores de diferenciação fibroblástica na progressão da nefropatia esquistossomótica em comparação com formas não esquistossomóticas de nefropatia, sugeriram que, apesar de a nefropatia esquistossomótica iniciar como uma glomerulopatia associada com aumento da celularidade mesangial, marcadores de diferenciação miofibroblástica e de diferenciação celular intersticial desempenham papel crucial na fase tardia da doença, e parece que o balanço entre as patologias glomerular e tubulointersticial é ainda mais inclinado para este último compartimento do que em outros tipos de glomerulopatia.

Uma limitação deste estudo é que não foi possível avaliar os transportadores NHE3, H⁺-ATPase e pendrina, impedindo a identificação de uma relação causal com as alterações de acidificação urinária que, embora menores, estavam presentes em 47% dos pacientes avaliados. Entretanto, ambos AQP2 e NKCC2 mostraram uma correlação (negativa e positiva, respectivamente) com o pH urinário sugerindo a participação destes transportadores, mesmo que indiretamente, com o déficit de acidificação urinária. Além disso, o canal ENaC não foi avaliado

para investigar o papel do transporte iônico de Na⁺ no epitélio para a diurese da água, o que poderia proporcionar novos conhecimentos nestes mecanismos.

Este é o primeiro estudo que avaliou a expressão dos transportadores tubulares através dos exossomas urinários em pacientes com EHE. Entretanto, em outras doenças infecciosas, já foi investigado. Na leishmaniose cutânea americana (LCA), Oliveira et al. (2011) encontraram uma diminuição na expressão da AQP2 e um aumento compensatório no NKCC2 em uma amostra de pacientes com disfunção tubular assintomática. Além disso, um aumento na expressão de NHE3, H⁺-ATPase e pendrina também foi identificado, o que pode justificar os achados de déficit de acidificação urinária encontrados nos pacientes do estudo (OLIVEIRA et al., 2011).

Na leptospirose, um estudo experimental investigou mudanças nos transportadores de sódio no rim e pulmão de hamsters inoculados com leptospiras. Os animais infectados mostraram redução da expressão do trocador NHE3 no túbulo proximal, aumento da expressão do NKCC2 e redução da expressão do AQP2 na medula renal. Os animais também apresentaram menor osmolaridade urinária, maior fração de excreção de sódio e potássio em comparação com os controles. No pulmão, foi observada uma redução na expressão da subunidade alfa dos canais epiteliais de sódio (α -ENaC), sugerindo um papel central desta mudança no edema pulmonar observado na leptospirose (ANDRADE et al., 2007).

Na hipertensão portal, a diminuição do volume de sangue arterial efetivo devido à vasodilatação esplâncnica aumenta a secreção de ADH e ativa os canais de aquaporina no ducto coletor renal (JOHN; THULUVATH, 2015). Neste estudo, avaliamos pacientes com EHE compensada, mas com longo tempo de diagnóstico e episódios anteriores de descompensação. Postulamos que estes episódios recorrentes de descompensação com alterações hemodinâmicas e consequente ativação dos canais de aquaporina podem produzir maior estresse na integridade celular, e a diminuição da expressão de AQP2 é uma resposta adaptativa a este mecanismo a longo prazo.

O transportador NKCC2 é responsável pela reabsorção de sódio, potássio e cloreto no ramo ascendente espesso da alça de Henle, promovendo uma diluição

do fluido luminal. Uma correlação negativa entre o NKCC2 e o FeK seria esperada, mas não ocorreu neste estudo. Uma possível explicação para este resultado pode ser o maior fornecimento de sódio e água para os segmentos tubulares mais distais devido à redução de AQP2, levando ao aumento da secreção tubular de potássio (PALMER, 2015).

Até o presente momento, nenhuma alteração histopatológica dos túbulos renais em pacientes infectados com *S. mansoni* foi relatada na literatura. Mais recentemente, um trabalho experimental com camundongos infectados por cercaria revelou, através de microscopia, alterações morfológicas leves a moderadas, principalmente edema e hipercromasia nuclear de células tubulares renais em comparação com controles não infectados. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou edema das células tubulares renais com formação de corpos fantasmas. Também houve atrofia e vacuolização das células tubulares em alguns túbulos renais. Algumas células tubulares renais apresentavam vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias danificadas e materiais eletrodensos (EID et al., 2017).

Os resultados do presente estudo apresentam importantes aspectos sobre a função tubular renal em pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. A EHE pode causar disfunção renal tubular assintomática, manifestando-se como defeito de acidificação urinária e incapacidade de concentrar a urina sem prejudicar a filtração glomerular. A diminuição da expressão de AQP2 e o aumento da expressão de NKCC2 em pacientes com EHE podem explicar a incapacidade de concentração urinária nesses pacientes, e podem ter influência hemodinâmica da EHE. O conhecimento das alterações tubulares na EHE, muitas vezes subestimadas na prática clínica nefrológica, deve contribuir na adoção de medidas para a prevenção do desenvolvimento de lesão renal aguda nestes pacientes em situações de descompensação de sua doença de base, visto que são pacientes com risco aumentado de desidratação. A detecção precoce das alterações renais e o tratamento de complicações são importantes, principalmente porque a EHE é uma doença que predomina em indivíduos mais jovens, que estão em maior risco de perda da função renal e devem se beneficiar de medidas para retardar a progressão da doença renal. Estudos adicionais são necessários para avaliar os impactos a longo prazo dessas alterações tubulares renais em pacientes com EHE.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A EHE está associada a alterações dos túbulos renais.
- Pacientes com EHE apresentaram diminuição da expressão de aquaporina-2 e aumento da expressão de NKCC2.
- A expressão de aquaporina-2 e NKCC2 não se correlacionaram com os níveis de MCP-1 e microalbuminúria, sugerindo que os níveis urinários elevados de MCP-1 na EHE parecem estar relacionados com as alterações glomerulares, mas não as tubulares.
- Défice de concentração e acidificação urinária foram alterações da função renal encontradas na EHE e podem ser explicadas pela diminuição da expressão de aquaporina-2 e aumento da expressão de NKCC2.
- Estudos adicionais são necessários para avaliar os impactos a longo prazo dessas alterações tubulares renais em pacientes com EHE.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABENSUR, H.; NUSSENZVEIG, I.; SALDANHA, L.B.; PESTALOZZI, M.S.C., BARROS, M.T.; MARCONDES, M.; BARROS, R.T. Nephrotic syndrome associated with hepatointestinal schistosomiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 34, p. 273-276, 1992.
- ADMYRE, C. et al. Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1969–1978, 2007.
- AMANN, B.; TINZMANN, R.; ANGETKORT, B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. **Diabetes Care**, v. 26, p. 2421-2425, 2003.
- ANDRADE, Z.A.; ROCHA, H. Schistosomal glomerulopathy. **Kidney Int.**, v. 16, p. 23-29, 1979.
- ANDRADE, Z.A.; VAN MARCK, E.A.E. Schistosomal glomerular disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 499-506, 1984.
- ANDRADE, Z.A.; VAN MARCK, E. Schistosomal glomerular disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 25-29, 1987.
- ANDRADE, Z.A. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 313-316, 1998.
- ANDRADE, L. et al. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 292, n. 2, p. 586–592, 2007.
- BANBA, N.; NAKAMURA, T.; MATSUMURA, M.; KURODA, H.; HATTORI, Y.; KASAI, K. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, v. 58, p. 684–690, 2000.
- BARBADO, J.; MARTIN, D.; VEGA, L.; ALMANSA, R.; GONÇALVES, L.; NOCITO, M.; JIMENO, A.; ORTIZ DE LEJARAZU, R.; BERMEJO-MARTIN, J.F. MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. **Cytokine**, v. 60, p. 583-586, 2012.
- BARRETO, A.V.M.F. et al. Análise da positividade da esquistossomose mansoni em regionais de saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010. **Epidemiologia Serviço Saúde**, v. 24, p. 87-96, 2015.
- BARSOUM, R.S. Schistosomal glomerulopathy: selection factors. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 2, p. 488-497, 1987.
- BARSOUM, R.S. Schistosomal glomerulopathies. **Kidney Int.**, v. 44, p. 1-12, 1993.

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

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

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J.A.; MEHTA, R.L.; PALEVSKY, P. Acute renal failure - Definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v. 8, p. R204–R212, 2004.

BEZERRA DA SILVA, P. et al. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 901-906, 2006.

BINA, J.C. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. **Rev. Patol. Trop.**, v. 10, p. 221-267, 1981.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 2, p. 5-11, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa de Controle da Esquistossomose**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7.ed. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informação de agravos de notificação/ Sistema de informação da esquistossomose. **Casos confirmados de Esquistossomose: Brasil**, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1995 a 2011. Brasília, 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/serie_historica_esquistossomose_07_08_2012.pdf>. Acesso em: 03 abr 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 5. ed. ampl. Brasília, 2005a. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 8 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144p. : il.

BRITO, T. *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 41, p. 269-272, 1999.

CARLIER, Y.; BOUT, D.; BINA, J.C.; CAMUS, D.; FIGUEIREDO, J.F.M.; CAPRON, A. Immunological studies in human schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, p. 949-954, 1975.

CHEEVER, A.W.; HOFFMANN, K.F.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol. Today**, v. 21, p. 465-466, 2000.

CHILD, C.G.; TURCOTTE, J.G. Surgery and portal hypertension. In: CHILD, C. G. (Ed.). **The liver and portal hypertension**. Philadelphia: Saunders, 1964, p. 50-64.

CHITSULO, L.; LOVERDE, P.; ENGELS, D. Disease Watch: Schistosomiasis. **TDR Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 12-13, 2004.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, jun. 2014.

CORACHAN, M. Schistosomiasis and international travel. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 446, 2002.

COUTINHO, H.M.; ACOSTA, L.P.; WU, H.W.; MCGARVEY, S.T.; SU, L.; LANGDON, G.C.; JIZ, M.A.; JARILLA, B.; OLVEDA, R.M.; FRIEDMAN, J.F.; KURTIS, J.D. Th2 cytokines are associated with persistent hepatic fibrosis in human *Schistosoma japonicum* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 288-295, 2007.

DANTAS, M.; DOS REIS, M.A.; OM, V.N.; RIBEIRO, R.A.; RAVINAL, R.C.; AL, R.J.; COIMBRA, T.M. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1: a biomarker of active tubulointerstitial damage in patients with glomerulopathies. **Kidney Blood Pressure Res.**, v. 30, p. 306-313, 2007.

DE BRITO, T.; CARNEIRO, C.R.; NAKHLE, M.C.; LIMA, D.M.; ABRANTES-LEMO, C.P.; SANDOVAL, M.; SILVA, A.M. Localization by immunoelectron microscopy of *Schistosoma mansoni* antigens in the glomerulus of the hamster (*Mesocricetus auratus*). **Kidney Exp. Nephrol.**, v. 6, p. 368-376, 1998.

DE WATER, R.; VAN MARCK, E.A.; FRANSEN, J.A.; DEELDER, A.M. *Schistosomamansoni*: ultrastructural localization of the circulating anodic antigen and the circulating cathodic antigen in the mouse kidney glomerulus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 38, p. 118-124, 1988.

DEELDER, A.M.; KORNELIS, D.; VAN MARCK, E.A.; EVELEIGH, P.C.; VAN EDGMOND, J.G. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in the mouse, hamster, and human infection. **Exp. Parasitol.**, v. 50, p. 16-32, 1980.

DIGEON, M.; DROZ, D.; NOEL, L.H.; RIZA, J.; RIEUMAILHOL, C.; BACH, J.F.; SANTORO, F.; CAPRON, A. The role of circulating immune complexes in the glomerular disease of experimental hepatosplenic schistosomiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 35, p. 329-337, 1979.

DIMOV, I.; JANKOVIC VELICKOVIC, L.; STEFANOVIC, V. Urinary Exosomes. **The Scientific World JOURNAL**, v. 9, p. 1107–1118, 2009

DOMINGUES, A.L.C.; DOMINGUES, L.A.W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. UFPE, 1994. v. 5, p. 91-105.

DOMINGUES, A.L.C.; NOVAIS, S. Esquistossomose mansônica. In: FILGUEIRA, N.A. (Org.). **Condutas em clínica médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. p. 659-669.

DOS SANTOS, W.L.C.; SWEET, G.M.M.; BAHIENSE-OLIVEIRA, M.; ROCHA, P.N. Schistosomal glomerulopathy and changes in the distribution of histological patterns of glomerular diseases in Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 901-904, 2011.

DUARTE, Daniella Bezerra. Avaliação da função renal em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica compensada. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

DUARTE, D. B. et al. Renal function in hepatosplenic schistosomiasis - An assessment of renal tubular disorders. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014

DUARTE, D. B. et al. Acute Kidney Injury in Schistosomiasis: A Retrospective Cohort of 60 Patients in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 2, p. 244–247, 2015.

DUARTE, D.B. et al. Doença renal associada à esquistossomose mansônica. In: DAHER, E.F.; BARROS, E.; SILVA JUNIOR, G.B. (Org.). **Nefrologia Tropical**. São Paulo: Balieiro, p. 101-119, 2019.

DUARTE, D. B. et al. Kidney biomarkers in tropical infections: an update. **Pathogens and Global Health**, p. 1–7, 2020. DOI.org/10.1080/20477724.2020.1799605

EID, R. A. et al. Ultrastructural changes of kidney in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Ultrastructural Pathology**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 2017

EL-KORAIE, A.F.; BADDOUR, N.M.; ADAM, A.G.; EL-KASHEF, E.H.; EL NAHAS, A.M. Cytoskeletal protein expression and regenerative markers in schistosomal nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 17, p. 803-812, 2002.

FUNASA. **Programa de Controle da Esquistossomose**. Brasília, 1995.

GÁMEZ-VALERO, A. et al. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–10, 2015.

GONZALES, P. A. et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 20, n. 2, p. 363–79, 2009.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

HANEMANN, A.L.P.; LIBÓRIO, A.B.; DAHER, E.F.; MARTINS, A.M.C.; PINHEIRO, M.C.C; SOUSA, M.S.; BEZERRA, F.S.M. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) in Patients with Chronic Schistosomiasis Mansoni: Evidences of Subclinical Renal Inflammation. **Plos One**, v. 8, p. 1-5, 2013.

JIANG, Y.; BELLER, D.I.; FRENDEL, G.; GRAVES, D. T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2423-2428, 1992.

JOHN, S.; THULUVATH, P. J. Hyponatremia in cirrhosis: Pathophysiology and management. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 11, p. 3197–3205, 2015.

KAMATH, P; WIESNER, R.H.; MALINCHOC, M. et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 464–470, 2001.

KANNO, K.; SASAKI, S.; HIRATA, Y. et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1540-1545, 1995

KASHANI, K.; CHEUNGPAITPORN, W.; RONCO, C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 55, n. 8, p. 1074–1089, 2017.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, p. 303-308, 2000.

KOEPPE, B.M.; STANTON, B.A. **Renal Physiology**. 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007.

LAMBERTUCCI, J.R.; GODOY, P.; BAMBIRRA, E.A.; NEVES, J.; TAFURI, W.L.; LEITE, V.H.R. Renal involvement in the association of Salmonellosis with *Schistosomamansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p 83-90, 1987.

LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; GERSPACHER-LARA, R.; RAYES, A.A.M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES C.M.F. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Trop.**, v. 77, p. 101-109, 2000.

LAMYMAN, M.J.; NOBLE, D.J.; NARANG, S.; DEHALVI, N. Small bowel obstruction secondary to intestinal schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, p. 885-887, 2006.

LÄSSER, C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 9, 2011a.

LÄSSER, C. et al. RNA-containing Exosomes in Human Nasal Secretions. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 25, n. 2, p. 89–93, 2011b.

LEAL NETO, O.B. et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 357-367, 2013.

LIMA VERDE, E.M; LIMA VERDE, F.A.A; LIMA VERDE, F.A.; SILVA JÚNIOR, G.B.; DAHER, E.F. Evaluation of renal function in human visceral leishmaniasis (kala-azar): a prospective study on 50 patients from Brazil. **J. Nephrol.**, v. 20, p. 432–438, 2007.

MADWAR, M.A.; VOLLER, A. Circulating soluble antigens and antibody in schistosomiasis. **Brit. Med. J.**, v. 1, 435-436, 1975.

MAGUIRE, J.H. Trematodes (Schistosomes and Other Flukes). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Ed.). **Mandell, Douglas and Bennett's: Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, p. 3595-3605, 2010.

MAHMOUD, A.A.F. Esquistossomose. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. p. 2127-2132.

MARTINELLI, R.; PEREIRA, L.J.; ROCHA, H. The influence of anti-parasitic therapy on the course of the glomerulopathy associated with *Schistosomiasis mansoni*. **Clin. Nephrol.**, v. 27, p. 229-232, 1987.

MARTINELLI, R.; NOBLAT, A.C.B.; BRITO, E.; ROCHA, H. *Schistosoma mansoni*-induced mesangiocapillary glomerulonephritis: Influence of therapy. **Kidney Int.**, v. 35, p. 1227-1233, 1989.

MARTINELLI, R.; PEREIRA, J.L.C.; BRITO, E.; ROCHA, R. Clinical course of focal segmental glomerulosclerosis associated with hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*. **Nephron**, v. 69, p. 131-134, 1995.

MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Envolvimento glomerular na esquistossomose mansônica. **J. Bras. Nefrol.**, v. 18, p. 279-282, 1996.

MARTINELLI, R.; SILVEIRA, M.A.; ROCHA, H. Glomerulonefrites associadas às doenças parasitárias. In: BARROS, R.T. (Org.). **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 352-371.

MCCULLOUGH, P. A. et al. Implementation of novel biomarkers in the diagnosis, prognosis, and management of acute kidney injury: Executive summary from the tenth consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI). **Contributions to Nephrology**, v. 182, p. 5–12, 2013.

MELO, M.E.; SILVEIRA, M.A.; MARTINELLI, R. Alterações renais nas doenças parasitárias: esquistossomose, leptospirose e malária. In: BARROS, E. (Org.). **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 309-316.

MENESES, G.C. et al. Novel kidney injury biomarkers in tropical infections: a review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pcebr.def>. Acesso em: 08 jul 2020.

MOLYNEU, D.H.; HOTEZ, P.J.; FENWICK, A. “Rapid-impact interventions”: how a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. **Plos.Med.**, v. 2, p. 1064–1070, 2005.

MOUNTFORD, A.P. Immunological aspects of schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 27, p. 243-246, 2005.

MUREA, M.; REGISTER, T.C.; DIVERS, J.; BOWDEN, D.W.; CARR, J.J.; HIGHTOWER, C.R.; XU, J.; SMITH, S.C.; HRUSKA, K.A.; LANGEFELD, C.D.; FREEDMAN, B.I. Relationships between serum MCP-1 and subclinical kidney disease: African American-Diabetes Heart Study. **BMC Nephrology**, v. 13, p. 148-156, 2012.

NEVES, P. D. M. DE M. et al. Schistosomiasis-associated glomerulopathy: Clinical aspects, pathological characteristics, and renal outcomes. **Clinical Nephrology**, v. 93, n. 5, p. 251–261, 2020.

NUSSENZVEIG, I.; DE BRITO, T.; CARNEIRO, C.R.; SILVA, A.M. Human *Schistosomamansonii*-associated glomerulopathy in Brazil. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 17, p. 4-7, 2002.

OLIVEIRA, R.A.; SILVA JR, G.B.; SOUZA, C.J.; VIEIRA, E.F.; MOTA, R.M.; MARTINS, A.M.; LIBÓRIO, A.B.; DAHER, E.F. Evaluation of renal function in leprosy: a study of 59 consecutive patients. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 23, p. 256–262, 2008.

OLIVEIRA, R. A. et al. Renal tubular dysfunction in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Kidney International**, v. 80, n. 10, p. 1099–1106, 2011.

OLIVEIRA, R.A.; LIMA, C.G.; MOTA, R.M.S.; MARTINS, A.M.C.; SANCHES, T.R.; SEGURO, A.C.S.; ANDRADE, L.C.; SILVA JÚNIOR, G.B.; LIBÓRIO, A.B.; DAHER, E.F. Renal function evaluation in patients with American Cutaneous Leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. **BMC Nephrology**, v. 13, p. 44-49, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Schistosomiasis. Fact sheet 115. Geneva: OMS; 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: 10 jul 2020.

OTT, B.R.; LIBBBEY, N.P.; RYTER, R.J.; TREBBIN, W.M. Treatment of schistosome-induced glomerulonephritis. A case report and review of the literature. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, p. 1477-1479, 1983.

PALMER, B. F. Regulation of Potassium Homeostasis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 6, p. 1050–1060, 2015.

PALANISAMY, V. et al. Nanostructural and Transcriptomic Analyses of Human Saliva Derived Exosomes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8577, 2010.

PASSOS, A.D.C.; AMARAL, R.S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 61-74, 1998.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 1354-1372.

PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 36, p. 13368–13373, 2004

QUEIROZ, F.P.; BRITO, E.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Nephrotic syndrome in patients with *Schistosoma mansoni* infection. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 22, p. 622-628, 1973.

RADIN, M.J.; YU, M.J.; STOEDKILDE, L.; MILLER, R.L.; HOFFERT, J.D.; FROKIAER, J.; PISITKUN, T.; KNEPPER, M.A. Aquaporin-2 regulation in health and disease. **Vet. Clin. Pathol.**, v.41, p. 455-470, 2012.

RESENDES, A.P.C.; SOUZA, S.R.; BARBOSA, C.S. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil,1992/2000. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, p. 1392-1401, 2005.

RODRIGUES, V.L.; OTONI, A.; VOIETA, I.; ANTUNES, C.M. LAMBERTUCCI JR. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 638-642, 2010.

ROJEK, A. et al. Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 15, p. 6037–6042, 2006.

ROSS, A.G.P.; BARTLEY, P.B.; SLEIGH, A.C.; OLDS, G.R.; LI, Y.; WILLIAMS, G.M.; MCMANUS, D.P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 1212-1220, 2002.

SEGERER, S.; NELSON, P.J.; SCHLÖNDORFF, D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiology and therapeutic studies. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, p. 152–176, 2000.

SOBH, M.A.; MOUSTAFA, F.E.; EL-HOUSSEINI, F.; BASTA, M.T.; DEELDER, A.M.; GHONIEM, M.A. Schistosomal specific nephropathy leading to end-stage renal failure. **Kidney Int.**, v. 31, p. 1006-1011, 1987.

SOBH, M.A.; MOUSTAFA, F.E.; SALLY, S.M.; DEELDER, A.M.; GHONIEM, M.A. Characterization of kidney lesions in early schistosomal-specific nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 3, p. 392-398, 1988.

SOBH, M.A.; MOUSTAFA, F.E.; SALLY, S.M.; DEELDER, A.M.; GHONIEM, M.A. Effect of anti-schistosomal treatment on schistosomal-specific nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 3, p. 744-751, 1988.

SOBH, M.; MOUSTAFA, F.; RAMZY, R.; SAAD, M.; DEELDER, A.; GHONEIM, M. *Schistosoma mansoni* nephropathy in Syrian golden hamsters: effect of dose and duration of infection. **Nephron**, v. 59, p. 121-130, 1991.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, p. 411-425, 2006.

STEPHENSON, L. The impact of schistosomiasis on human nutrition. **Parasitology**, v. 107, p. 107-123, 1993.

STREET, J.M. et al. Urine Exosome Isolation and Characterization. **Methods Mol. Biol.**, v. 1641, p. 413-423, 2017.

TAKATA, K.; MATSUZAKI, T.; TAJIKA, Y.; ABLIMIT, A.; HASEGAWA, T. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. **Histochem. Cell. Biol.**, v.130, p. 197-209, 2008.

VAN BALKOM, B. W. M. et al. Exosomes and the kidney: Prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. **Kidney International**, v. 80, n. 11, p. 1138–1145, 2011.

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

VAN MARCK, E.A.E. The glomerulopathy associated with *Schistosoma mansoni* infection. An experimental study in the mouse. **Acta Leiden.**, v. 50, p. 1-123, 1983.

VAN VELTHUYSEN, M.L.F. Glomerulopathy associated with parasitic infections. **Parasit.Today**, v. 12, p. 102-107, 1996.

VANDERWERF, M.J.; DE VALASI, S.J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C.W.N.; NAGELKERKE, N.J.D.; HABBEMA, J.D.F.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta.Trop.**, v. 86, p. 125- 139, 2003.

VITORINO, R.R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev. Bras. Clin. Med.**, v. 10, p. 39-45, 2012.

ZHOU, H. et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. **Kidney International**, v. 69, n. 8, p. 1471–1476, 2006.

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PARECER CONSUBSTANCIADO



PROTOCOLO: 004228-2011-81

I. Identificação

1. **Título: Avaliação da função renal em pacientes portadores de esquistossomose mansônica.**
2. Pesquisador(a) orientador(a): Dra. Elizabeth de Francesco Daher. Orientandos(as): Daniella Bezerra Duarte.
3. Instituição onde se realizará: UFAL-FAMED.
4. 4. Data de apresentação ao CEP: 1-3-2011

II. Objetivos

Avaliar a função renal de pacientes portadores de esquistossomose mansônica em duas diversas formas clínicas. Identificar alterações da função renal a nível glomerular e/ou tubular. Correlacionar as manifestações clínicas da doença esquistossomótica com o comportamento da função renal. Avaliar os fatores de risco relacionados ao déficit de função renal. Analisar o tratamento instituído e as complicações pelos pacientes durante acompanhamento. Avaliar a presença dos transportadores de sódio e em caso de redução de expressão dessas proteínas de membrana correlacionar com o quadro clínico-laboratorial do paciente.

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo e controlado. O estudo será realizado no Hospital Professor Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas, no período de 01 de março de 2011 a 01 de março de 2013, com pacientes portadores acompanhados no ambulatório de gastroenterologia. Serão avaliados 60 doentes, sendo 15 de cada uma das seguintes formas clínicas de esquistossomose mansônica: assintomática, intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, com idade entre 18 e 65 anos, ambos o sexos.

III. Comentários do Relator.

O Projeto está bem redigido e apresenta Introdução, Justificativa, Objetivos, Metodologia, critérios de inclusão e exclusão, Cronograma, referências, currículos, modelo do TCLE e autorização do Hospital Universitário. Atende às exigências da Resolução CNS 196/96, pois não apresenta problemas éticos para a realização da pesquisa.

Sugerimos ao Comitê de Ética em Pesquisa que considere, salvo melhor entendimento, o Projeto em pauta como aprovado.

IV. Data da Reunião:

ANEXO B

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Maceió – AL, 27/06/2011

Senhor (a) Pesquisador (a) Elizabeth de Francesco Daher
Daniella Bezerra Duarte

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 14/05/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo **004228/2011-81** so o título **Avaliação da função renal em pacientes portadores de esquistossomose mansônica**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresetados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e). Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

Wafra Nazareno

St. Dir. Daniel Menezes
Universidade Federal de Alagoas
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO C

ARTIGOS PUBLICADOS

Tropical Medicine and International Health

doi:10.1111/tmi.13461

VOLUME 00 NO 00

Aquaporin-2 and NKCC2 expression pattern in patients with hepatosplenic schistosomiasis

Daniella Bezerra Duarte^{1,2,3,4}, Gdayllon Cavalcante Meneses¹, Dânya Bandeira Lima⁵, Alice Maria Costa Martins⁵, Geraldo Bezerra da Silva Júnior⁶ and Elizabeth De Francesco Daher¹

1 Post-Graduation Program in Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

2 School of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

3 School of Medicine, Tiradentes University Center, Maceió, Brazil

4 School of Medicine, CESMAC University Center, Maceió, Brazil

5 Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

6 School of Medicine, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil

Abstract

OBJECTIVE *Schistosoma mansoni* infection is considered a public health problem. Glomerular involvement in schistosomiasis is a well-documented complication, especially in hepatosplenic schistosomiasis (HSS). However, renal tubular function is poorly understood. The aim of this study was to investigate, through urinary exosomes, tubular transporters functionally in HSS patients.

METHODS Cross-sectional study of 20 HSS patients who had isolated exosomes from urine samples. Protease inhibitor was added in the urine samples who were immediately frozen at -80°C for further exosomes isolation. After urine had thawed, urinary exosomes were obtained using extensive vortexing, centrifugation and ultracentrifugation steps of urine. Urinary transporters expression from exosomes was evaluated by western blot, including NHE3, AQP2 and NKCC2. Charge amounts for gel electrophoresis were adjusted by urinary creatinine concentration of each patient to avoid urinary concentration bias. All protein expression of HSS patients was relative to healthy controls.

RESULTS The expression of aquaporin-2 (AQP2) was lower in HSS patients than in controls (46.8 ± 40.7 vs. $100 \pm 70.2\%$, $P = 0.03$) and the expression of the NKCC2 co-transporter was higher (191.7 ± 248.6 vs. $100 \pm 43.6\%$, $P = 0.02$).

CONCLUSIONS The decrease of AQP2 and the increase of NKCC2 expression in HSS patients seem to be involved with the inability of urinary concentration in these patients. These data show renal tubular abnormalities in HSS patients without manifest clinical disease.

keywords hepatosplenic schistosomiasis, renal tubular function, urinary exosomes, aquaporin-2, NKCC2

Introduction

Schistosomiasis infection is considered a public health problem, associated with high morbidity and mortality if untreated, presenting with chronic complications especially in people with high parasitic load [1, 2]. Schistosomal glomerulopathy is a well-documented complication and occurs especially in those patients with HSS. Glomerular involvement in schistosomiasis has an immunological nature, related to the release of antigenic molecules produced by the parasite which trigger the formation of immune complexes deposited in the glomeruli [3–5].

The involvement of renal tubular function in schistosomiasis is poorly understood. In a previous study of 20 HSS patients in our group, acidification deficit and urinary concentration inability were observed in 45% and

85% of the patients, respectively. Moreover, urinary MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) values were higher in the HSS group than healthy control group and were positively correlated with 24-hour albuminuria and proteinuria levels [6].

Exosomes are nanovesicles (30–100 nm) of endocytic origin secreted in extracellular space or body fluids when a multivesicular bodies merges with the plasma membrane, transporting cytoplasmic and cell membrane molecules. Exosomes are not filtrated by glomeruli. Therefore, urinary exosomes are secreted by virtually all types of renal cells, promising biomarkers capable of identifying changes in renal physiology [7]. In addition, urine collection is an easy and non-invasive sample. Some studies have shown that aquaporin-2 (AQP2) is excreted in urine via exosomes and its presence is correlated with AQP2



Kidney biomarkers in tropical infections: an update

Daniella Bezerra Duarte ^{a,b,c,d}, Maria Carolina Santa Rita Lacerda ^d, Yara Janaína Porto Ribeiro ^d,
 Maria Zenaide Dias Ribeiro ^e, Matheus de Almeida Frederico ^c
 and Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira ^{b,c}

^aPost-Graduation Program in Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ^bSchool of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil; ^cSchool of Medicine, Tiradentes University Center, Maceió, Brazil; ^dSchool of Medicine, CESMAC University Center, Maceió, Brazil; ^eDepartment of Internal Medicine, Dr. Waldemar Alcântara General Hospital, Fortaleza, Brazil

ABSTRACT

Neglected tropical diseases affect over 1 billion people, and cause 170,000 deaths each year. They result in disability, stigma and disfigurement, and also push families into poverty. Tropical infections can involve the kidney, presenting as a wide variety of ways, varying from transient urinary abnormalities to severe acute kidney injury (AKI). It is important to assess renal function in patients with tropical infections for earlier detection of AKI, appropriate treatment and prevention of Chronic Kidney Disease (CKD) outcome in some of them. There was an exponential increase in research on new kidney biomarkers that were earlier and specific for renal damage but few in the scope of tropical infections. In this review, we focus on kidney biomarkers that are being studied in some of the most prevalent tropical infections such as visceral leishmaniasis, leptospirosis, malaria, schistosomiasis and leprosy. Further studies are needed to evaluate the usefulness of renal biomarkers in the early diagnosis of renal diseases associated with tropical infections.

KEYWORDS

Kidney biomarkers; neglected tropical diseases; acute kidney injury; chronic kidney disease; diagnosis

Introduction

Neglected tropical diseases affect over 1 billion people, and cause 170,000 deaths each year. They are most prevalent in the so-called tropical zone that traverse the globe from Central America, Mexico, parts of South America, the Caribbean, Africa, the Middle East to Southeast Asia and result in disability, stigma and disfigurement, and also push families into poverty [1,2]. Tropical infections are caused by a variety of bacteria, viruses and parasitic organisms across varying geographical regions and the most of them are acute, presenting as a febrile illness with involvement of multiple organ systems, including the kidney. It can involve the glomerular, tubulointerstitial and vascular compartments of the kidney, presenting as a wide variety of ways, varying from transient urinary abnormalities to severe acute kidney injury (AKI) [2].

According to the World Health Organization (WHO), biomarker is any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and influence or predict the incidence of outcome or disease [3]. Another definition of biomarkers includes any measurement reflecting an interaction between a biological system and a potential hazard, which may be chemical, physical, or biological. The measured response may be functional and physiological, biochemical at the cellular level, or a molecular interaction [4].

Serum creatinine has been used as a biomarker of chronic kidney disease (CKD) and acute kidney injury for more than one century, but it is well known to be a late rising marker in the blood of patients, being these clinical conditions often diagnosed only when the disease is established. For this reason, there was an exponential increase in research on new kidney biomarkers that were earlier and specific for renal damage [5].

In this review, we focus on kidney biomarkers that are being studied in tropical infections. We discuss here the following tropical infections: visceral leishmaniasis, leptospirosis, malaria, schistosomiasis and leprosy; and the already studied kidney biomarkers in these diseases: neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), cystatin C, transcription factor nuclear factor kappa B (NF-κB) and microalbuminuria.

Kidney biomarkers in visceral leishmaniasis

Visceral Leishmaniasis (VL)-related nephropathy is known both in humans and animals. However, in humans, most studies are based on very few cases, which showed different manifestations such as acute proliferative glomerulonephritis, collapsing focal segmental glomerulosclerosis, acute interstitial nephritis,

RESEARCH ARTICLE

Renal Function in Hepatosplenic Schistosomiasis – An Assessment of Renal Tubular Disorders

Daniella Bezerra Duarte^{1,2}, Lucas Alexandre Vanderlei¹, Raianne Kívia de Azevêdo Bispo¹, Maria Eliete Pinheiro¹, Geraldo Bezerra da Silva Junior³, Alice Maria Costa Martins⁴, Gdayllon Cavalcante Meneses⁴, Elizabeth De Francesco Daher^{2*}

1. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil, 2. Department of Internal Medicine, Post-Graduation Program in Medical Sciences, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, 3. School of Medicine, Post-Graduation Program in Collective Health, Health Sciences Center, University of Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil, 4. Department of Pharmacy and Clinical Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

*ef.daher@uol.com.br


 OPEN ACCESS

Citation: Duarte DB, Vanderlei LA, Bispo RKdA, Pinheiro ME, Silva Junior GBd, et al. (2014) Renal Function in Hepatosplenic Schistosomiasis – An Assessment of Renal Tubular Disorders. PLoS ONE 9(12): e115197. doi:10.1371/journal.pone.0115197

Editor: Giovanna Valenti, University of Bari Aldo Moro, Italy

Received: August 15, 2014

Accepted: November 19, 2014

Published: December 22, 2014

Copyright: © 2014 Duarte et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the Brazilian Research Council (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background: Renal involvement in *Schistosoma mansoni* infection is not well studied. The aim of this study is to investigate the occurrence of renal abnormalities in patients with hepatosplenic schistosomiasis (HSS), especially renal tubular disorders.

Methods: This is a cross-sectional study with 20 consecutive patients with HSS followed in a medical center in Maceió, Alagoas, Brazil. Urinary acidification and concentration tests were performed using calcium chloride (CaCl₂) after a 12-h period of water and food deprivation. The biomarker monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was quantified in urine. Fractional excretion of sodium (FE_{Na+}), transtubular potassium gradient (TTKG) and solute-free water reabsorption (TcH₂O) were calculated. The HSS group was compared to a group of 17 healthy volunteers.

Results: Patients' mean age and gender were similar to controls. Urinary acidification deficit was found in 45% of HSS patients. Urinary osmolality was significantly lower in HSS patients (588 ± 112 vs. 764 ± 165 mOsm/kg, $p=0.001$) after a 12-h period of water deprivation. TcH₂O was lower in HSS patients (0.72 ± 0.5 vs. 1.1 ± 0.3 , $p=0.04$). Urinary concentration deficit was found in 85% of HSS patients. The values of MCP-1 were higher in HSS group than in control group (122 ± 134 vs. 40 ± 28 pg/mg-Cr, $p=0.01$) and positively correlated with the values of microalbuminuria and proteinuria.

Acute Kidney Injury in Schistosomiasis: A Retrospective Cohort of 60 Patients in Brazil

Daniella Bezerra Duarte*†‡, Lucas Alexandre Vanderlei*, Raianne Kívia de Azevêdo Bispo*, Maria Eliete Pinheiro*, Geraldo Bezerra da Silva Junior†§, and Elizabeth De Francesco Daher||, *Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Alagoas, CEP 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; †School of Medicine, Post-Graduation Program in Collective Health, University of Fortaleza, CEP 60811-905, Fortaleza, Ceará, Brazil; ‡Run Vicente Linhares, 1198, CEP 60135-270, Fortaleza Ceará, Brazil; §School of Medicine, Post-Graduation Program in Collective Health, Health Sciences Center, University of Fortaleza, CEP-60811-905, Fortaleza, Ceará, Brazil; ||Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, CEP 60430-160, Fortaleza, Ceará, Brazil. Correspondence should be sent to: geraldobezerrajr@yahoo.com.br

ABSTRACT: The aim of this study is to investigate renal involvement in schistosomiasis. This is a retrospective cohort of 60 consecutive patients with schistosomiasis admitted to a university hospital in Maceió, Brazil. The patients were divided into 2 groups: patients with and without acute kidney injury (AKI) according to the RIFLE criteria. We compared the groups for differences in clinical manifestations and laboratory tests. Patients' mean age was 58 ± 16 yr, and 56.7% were female. The average length of hospital stay was 16.4 ± 12.1 days. Patients with hypertension and diabetes were 35% and 21.7% respectively. The main clinical symptoms and signs presented were ascites (86.7%), splenomegaly (80%), and hepatomegaly (63.3%). Current or previous history of upper gastrointestinal bleeding was found in 45% of patients, esophageal varices on endoscopy were present in 92%, and periportal fibrosis on ultrasound examination in 81% of patients. AKI incidence was 43.3% during hospital stay. Mean age and length of hospitalization were higher in the AKI group. Diuretic use, such as furosemide and spironolactone, ascites, and AST levels were also associated with AKI. Death occurred in 5 cases (8.5%), 4 of them in the AKI group. The classifications Child-Pugh score (CHILD) and Model for End-Stage Liver Disease (MELD), used to assess the severity and prognosis of chronic liver disease, presented higher scores among patients with AKI (CHILD: 9.5 ± 1.5 vs. 8.4 ± 1.7, $P = 0.02$; MELD: 19 ± 5.8 vs. 13 ± 3.9, $P < 0.001$). Renal dysfunction is an important feature of schistosomiasis, which is associated with significant morbidity and possible increased mortality. Further studies are necessary to establish the mechanisms through which schistosomiasis can lead to renal dysfunction.

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by organisms from the genus *Schistosoma*, which is endemic in tropical areas (Ross et al., 2002; Chitsulo et al., 2004). It is estimated that more than 200 million people worldwide have schistosomiasis, with an estimated mortality of approximately 100,000 deaths per year (Chitsulo et al., 2004; Maguire, 2010). In Brazil, only *Schistosoma mansoni* is present. The disease is found in almost the entire national territory, but with a higher prevalence in northeastern states where it is considered endemic. An estimated 8 million people in Brazil are infected (Chitsulo et al., 2004; Resendes et al., 2005; Maguire, 2010; Ministério da Saúde, 2010).

In the infection by *S. haematobium*, a parasitic disease predominant in African countries, urinary tract involvement is common (Brower et al., 2003). Hematuria and dysuria can be observed due to inflammation and ulceration in the bladder mucosa, generally occurring 3 to 4 mo after primary infection. Polyps, hypertrophic nodules, and egg deposition can be observed through cystoscopy. Granulomas, fibrosis, and calcifications in the vesical wall can cause vesico-ureteral reflux and obstructive uropathy, leading to hydronephrosis, chronic bacteriuria, vesical cancer, and, less frequently, renal insufficiency (Maguire, 2010).

Schistosoma mansoni infection associated kidney disease is not frequently described in the literature. Chronic glomerular involvement is the most frequently reported kidney disease (Silva Junior et al., 2013). To

the best of our knowledge, there are no reports describing acute kidney injury (AKI) in patients with schistosomiasis. Since AKI is not well studied in schistosomiasis and its pathophysiology is not completely understood, this study was conducted to investigate the occurrence of AKI in hospitalized patients with hepatosplenic schistosomiasis and to describe its clinical and laboratory features. The findings of this study are important to parasitology because they will increase knowledge about schistosomiasis-associated AKI, an important and potentially fatal complication that can be found in this disease.

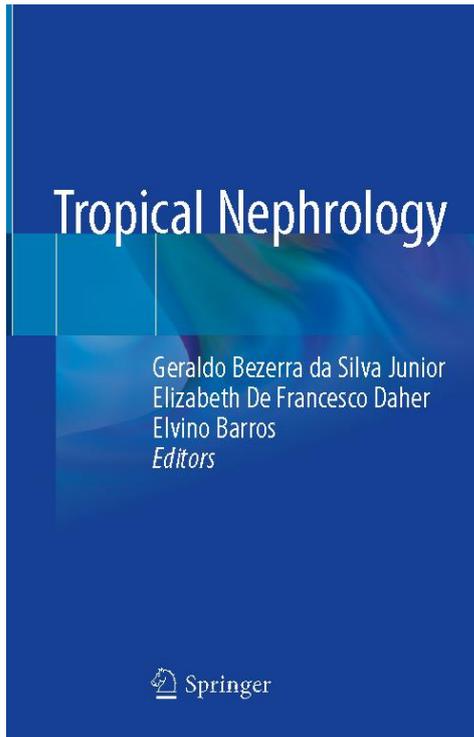
This is a retrospective study conducted with 60 consecutive patients with epidemiologic, clinical, and laboratory diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis who had been admitted to the Professor Alberto Antunes University Hospital in Maceió, Brazil, between November 2008 and October 2012. The protocol of this study was approved by the Ethics Committee of the institution.

Etiologic diagnosis of schistosomiasis was based on a previous detection of schistosome eggs in feces, rectal, or liver biopsy. Epidemiological criterion was based on the patient's origin area endemic for schistosomiasis. Clinical diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis was based on the presence of hepatomegaly and splenomegaly in physical or ultrasonographic examination, periportal fibrosis, increased portal vein diameter, history of gastrointestinal bleeding, presence of esophageal varices at endoscopy, or previous splenectomy. A standardized case investigation form was used to record demographical, epidemiological, clinical, and laboratory data. Patients with previous kidney disease (acute or chronic), nephrolithiasis, and use of nephrotoxic drugs were excluded as well as patients who did not meet diagnostic criteria for schistosomiasis or had, besides schistosomiasis, other liver diseases (hepatitis B and C, alcohol-related, autoimmune, cancer) (Fig. 1). The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Institution.

The CHILD (Child-Pugh) and MELD (Model for End-Stage Liver Disease) scores, used to assess the severity and prognosis of chronic liver disease of patients, were calculated in all patients (Child and Turcotte, 1964; Pugh et al., 1973; Kamath et al., 2001).

AKI was defined according to the RIFLE criteria, a classification system for AKI formed by the acronym Risk of renal dysfunction (R), Injury to the kidney (I), Failure of kidney function (F), Loss of kidney function (L), and End-stage kidney disease (E) (Bellomo et al., 2004). The RIFLE criteria take into account acute changes in serum creatinine and urine output. The diuresis criterion was not used to define AKI. We used only the acute change in serum creatinine. AKI was detected at hospital admission and during hospital stay. Patients who had elevated serum creatinine levels at admission and whose levels remained stable were not classified as AKI. The patients were divided into 2 groups: patients with and without AKI. We compared these 2 groups to investigate differences in clinical manifestations, laboratory features, and factors associated with AKI.

Statistical analysis was performed using the software SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, Illinois). The chi-square test was performed to compare percentages, and Student's *t*-test was used to compare means. To verify the normality of distribution of continuous variables, the Kolmogorov-Smirnov test was used. The Levene test was used to compare variances. In the condition of data normality, the comparison between 2 means was



Chapter 9 Schistosomiasis Mansoni-Associated Kidney Disease



Daniella Bezerra Duarte, Elizabeth De Francesco Daher,
Maria Eliete Pinheiro, and Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira

9.1 Introduction

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, of which five species parasitize man: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. mekongi*. The disease is endemic in tropical regions, where millions of people currently live in areas at risk of transmission. Only *S. mansoni* is found in Brazil, which is present in 19 states, with the highest endemicity observed in the northeastern states [1, 2].

Schistosomiasis-associated kidney disease is not often described in the literature, and most studies show an association between the disease and glomerular alterations, especially in those patients with more severe clinical presentation. In this chapter, we will review the general aspects of the disease and describe the characteristics of renal involvement in schistosomiasis mansoni.

9.2 Epidemiology

Schistosomiasis is a tropical disease currently found in approximately 70 countries, mainly in Africa, the Eastern Mediterranean, and South America. An estimated 200 million people are infected, 85% of whom live in sub-Saharan Africa, of which approximately 120 million develop symptoms, 20 million have severe disease, and 100,000 die each year [3, 4].

D. B. Duarte (✉) · M. E. Pinheiro · M. J. C. Oliveira
School of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil

E. De Francesco Daher
Post-Graduation Program in Medical Sciences, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

© Springer Nature Switzerland AG 2020
G. Bezerra da Silva Junior et al. (eds.), *Tropical Nephrology*,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-44500-3_9

113