

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**Microalbuminúria como preditor de doença cardiovascular e
renal em pacientes e em um modelo experimental
esquistossomóticos**

Milton Cezar Compagnon

Orientador: Prof Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife, 2013

Milton Cezar Compagnon

Microalbuminúria como preditor de doença cardiovascular e renal em pacientes e em um modelo experimental esquistossomóticos

Tese apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Doutorado em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Compagnon, Milton Cezar

Microalbuminúria como preditor de doença cardiovascular e renal em pacientes e em um modelo experimental esquistossomóticos/ Milton Cezar Compagnon– Recife: O Autor, 2013.

126 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Schistosoma mansoni* 2. Creatinina 3. Sistema cardiovascular-
doenças I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Título**

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-224

Milton Cezar Compagnon

Microalbuminúria como preditor de doença cardiovascular e renal em pacientes e em um modelo experimental esquistossomóticos

Tese apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Doutorado em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada por:

José Luiz de Lima Filho

Maria do Carmo de Barros Pimentel

Maria da Paz Carvalho da Silva

Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues

Rubem Carlos de Araújo Guedes

Data: 27/02/2013

Em memória ao meu querido irmão
Roney Luiz Compagnon, pela inspiração
desde o início de minha trajetória
profissional.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS.

A meus pais pelo carinho, pelo apoio sempre presente.

Ao meu orientador Prof. José Luiz de Lima Filho, pela oportunidade e orientação
Ao pesquisador Leucio Duarte Vieira Filho, do laboratório de fisiologia e farmacologia renal – UFPE, por ter compartilhado seus conhecimentos de laboratório no início de minha caminhada no doutorado.

Aos INCs, do laboratório de fisiologia e farmacologia renal, Felipe, Marcelo e Wiliam pelo apoio dado na realização de procedimentos.

Aos funcionários do biotério do LIKA, pelo cuidado dispensado aos animais utilizados nos procedimentos desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Roberto e Gustavo, pelo apoio na organização de materiais utilizados no estudo.

.

Sumário

Lista de abreviações	i, ii
Lista de figuras	iii, iv, v
Lista de tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	vii
Capítulo I	18
Introdução	18
1.1 Objetivos	23
2. Capítulo I	24
2.1 Esquistossomose	24
2.2 Esquistossomose mansônica aguda	26
2.3 Esquistossomose hepatointestinal (EHI)	26
2.4 Esquistossomose hepatoesplênica	27
3. Albumina	28
3.1 Síntese de albumina	30
3.2 Degradação da albumina	31
3.3 Função da albumina	32
3.4 Microalbuminúria e doença cardiovascular	34
4. Avaliação da função renal e biomarcadores	
4.1 Creatinina	
4.2 Cistatina C	41
5. Estresse oxidativo	42

6. Referências bibliográficas	46
Capítulo II - Microalbuminuria in patients infected with schistosomiasis in Pernambuco-Brazil.	57
Capítulo III – Cálculo da filtração glomerular em pacientes portadores de esquistossomose mansônica com os biomarcadores cistatina C sérica e creatinina sérica.	78
Capítulo IV – Estresse oxidativo aumentado e proteinúria elevam níveis pressóricos em ratos infectados pelo parasita <i>Schistosoma mansoni</i>.	99
Conclusão	121
Anexos	122

Lista de abreviações

AFRAN – Associação Africana de Nefrologia

ANOVA – Análise de variância

AVC – Acidente vascular cerebral

DCE – Depuração da creatinina endógena

DCV – Doença cardiovascular

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EHE – Esquistossomose hepatoesplênica

EHI – Esquistossomose hepatointestinal

EROs – Espécies reativas de oxigênio

EPM – Erro padrão da média

FGR – Filtração glomerular renal

Grupo C – Grupo controle

Grupo CS – Grupo controle com salina

Grupo Sh – Grupo *Shistosoma mansoni* com água

Grupo SM – Grupo *Shistosoma mansoni*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgM – Imunoglobulina M

IMC – Índice de massa corporal

IRA – Insuficiência renal aguda

KCL – Cloreto de Potássio

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

MDRD – Modificação da dieta na doença renal

mL - Mililitro

mg/g miligrama por grama

mg/dl – miligramas por litro

mg/l – miligrama por litro

nm - nanômetro

NKF – National Kidney Fundation – Fundação Nacional do Rim

KDa – Kilo Dalton

PENIA – Partícula aprimorada de imunoensaio nefelométrico

PETIA – Partícula aprimorada de turbidimetria

TBARS – Ácido tiobarbitúrico

mRNA – Acido ribonucleico mensageiro

SAP – Pressão artéria sistólica

PA – Pressão arterial

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

SHR – Ratos espontaneamente hiperten

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Mapa da esquistossomose no Estado de Pernambuco – PE	20
Figura 2. Ciclo de vida do parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 3. Molécula de albumina com seus subdomínios	29

Capítulo II

Figura 1. Relation of levels of urinary albumin and creatinine in patients infected with <i>Schistosoma mansoni</i> followed-up for 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Albumin/creatinine urinary in men (A) and women (B). Cont: healthy patients (Men: 17; Womens: 23); SM: patients infected with <i>Schistosoma mansoni</i> (Men: 71; Women: 59). Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months; and ♦P<0,05 Vs. Cont.	71
Figura 2. Glomerular filtration rate in renal pacientes infected with <i>Schistosoma mansoni</i> Followed by 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Glomerular renal filtration (GFR) in men (A) and women (B) respectively. Cont: healthy patients (Men: 17; Women: 23); SM: patients infected with <i>Schistosoma mansoni</i> (Men: 71; Women: 59 Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months and ♦P<0,05 Vs. Cont.	71
Figura 3. Arterial pressure levels in patients infected with <i>Schistosoma mansoni</i> followed for 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Systolic arterial pressure (SAP), diastolic (DAP) and mean (MAP) in men (A, C e E, respectively) and women (B, D e F). Cont: healthy patients (men: 17; women: 23);	72

SM: patients infected with *Schistosoma mansoni* (Men: 71; Women: 59). Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months; †P<0,05 Vs. 12 months; and ♦P<0,05 Vs. Cont.

Capítulo III

Figura 1. Taxa de filtração glomerular renal em pacientes infectados com o parasita *Schistosoma mansoni* no período de 12 meses (P0= zero mês, P1=6 meses, P2= 12 meses). Indivíduos do sexo masculino (A, C, e E respectivamente) e indivíduos do sexo feminino (B, D e F). C: pacientes saudáveis (Homens: 17; Mulheres: 23); SM: pacientes infectados por *Schistosoma mansoni* (Homens: 71; Mulheres: 59). Dados apresentados como média $\pm$ E.P.M. As diferenças ao longo do acompanhamento foram avaliadas através da ANOVA seguida do teste de Tukey. As diferenças entre grupos experimentais foram analisadas utilizando o teste t de Student. *P<0,05 versus 6 meses e ♦P<0,05 versus Cont.

94

Capítulo IV

Figura 1. Depuração ou clearance da creatinina (A) e excreção de proteínas urinárias (B) de ratos infectados com *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles: aos 90, 120 e 150 dias de idade. Os grupos foram os seguintes: Controle com água (C), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Shistosoma com água (Sh), ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Controle com salina (CS), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%; e ShS, ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%. PC = peso corporal. Os dados são expressos em média $\pm$ SEM. P <0,05: †Vs. ratos com 90 dias de idade; ‡Vs. ratos com 120 dias de idade; *Vs. ratos não infectados; ♦Vs. ratos tratados com água potável.

113

Figura 2. Estresse oxidativo por peroxidação lipídica tecidual de ratos infectados com *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles. A peroxidação lipídica foi estimada

114

por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com medição em níveis renal (A) e hepático (B) em ratos com 150 dias de idade. Os grupos foram os seguintes: Controle com água (C), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Shistosoma com água (Sh), ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Controle com salina (CS), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%; e ShS, ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%. MDA= malondialdeído. Os dados são expressos em média $\pm$ SEM. $P < 0,05$: $\blacklozenge$ Vs. ratos tratados com água potável.

v

Figura 3. Pressão arterial sistólica (SAP) de ratos infectados com *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles. A pressão arterial sistólica foi medida por pletismografia com os animais conscientes aos 90, 120 e 150 dias de idade. Os grupos foram os seguintes: Controle com água (C), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Shistosoma com água (Sh), ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Controle com salina (CS), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com 1% salina e ShS, ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina 1%. Os dados são expressos em média $\pm$ SEM. $P < 0,05$: $\blacklozenge$ Vs. ratos tratados com água potável.

114

Figura 4. Excreção urinária de ratos infectados com *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles aos 90, 120 e 150 dias de idade. Os grupos foram os seguintes: Controle com água (C), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Shistosoma com água (Sh), ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com água potável; Controle com salina (CS), ratos não infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%; e ShS, ratos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com solução salina a 1%. PC = peso corporal. Os dados são a média $\pm$ SEM. $P < 0,05$: $\dagger$ Vs. ratos com 90 dias de idade, $\ddagger$ Vs. ratos com 120 dias de idade; $\blacklozenge$ Vs. ratos tratados com água potável.

115

Lista de Tabelas**Capítulo II**

Table 1. Degrees of fibrosis in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. 77

Table 2. Clinical characteristics of study participants. 77

Capítulo III

Tabela 1. Valores de referência de TFG (National Kidney Foundation (2003). 98

Tabela 2. Características clínicas dos participantes do estudo 98

Resumo

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e outras 700 milhões vivem em áreas endêmicas de países em desenvolvimento, o que tem sido um problema de saúde pública. Em 2009, havia 6.780.683 casos confirmados da doença no Brasil. A esquistossomose crônica pode levar a processos inflamatórios hepáticos graves, desencadear distúrbios renais e danos celulares que incluem o aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial. Isto contribui para o surgimento da microalbuminúria, uma perda de proteínas que pode ser um preditor precoce de doenças cardiovasculares e renais. Neste estudo, foi investigado em 130 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica ou hepatointestinal a ocorrência de microalbuminúria, e sua correlação com o aumento dos níveis pressóricos. A função renal também foi avaliada utilizando biomarcadores (Cistatina C / Creatinina) e estimada através da medida da taxa de filtração glomerular. Os valores obtidos foram comparados com 40 pessoas (Grupo Controle) saudáveis, advindos das mesmas classes sociais. Por fim, foi investigado em ratos infectados pelo parasita *Schistosoma mansoni*, a elevação da pressão arterial, a ocorrência de proteinúria, o estresse oxidativo renal e o estresse oxidativo hepático. Dos 130 pacientes (grupo *Schistosoma mansoni*) avaliados, 14,6% (11 homens e 8 mulheres) apresentaram microalbuminúria (valores entre 30 e 300 mg / g de creatinina) em comparação ao grupo controle, que mostrou apenas 5 % (um homem e uma mulher) com microalbuminúria. Dos 19 pacientes que apresentaram microalbuminúria, 15 tinham esquistossomose hepatoesplênica, e 4 tinham esquistossomose hepatointestinal. A taxa de filtração glomerular renal e a pressão arterial aumentaram no grupo *Schistosoma mansoni* em relação ao Grupo Controle. O resultado obtido na avaliação da taxa de filtração glomerular com a Cistatina C sérica foi superior ao resultado obtido com a Creatinina sérica. No estudo realizado com animais, os

ratos infectados pelo parasita *Schistosoma mansoni* tiveram aumento da pressão arterial e perda de proteína na urina em comparação ao grupo controle. Este processo foi mais intenso em animais infectados e tratados com sobrecarga de sódio. Os animais não infectados pelo parasita *Schistosoma mansoni* e que não foram tratados com a sobrecarga de sódio, não tiveram proteinúria, nem aumento dos níveis pressóricos. Todos os resultados obtidos permitem sugerir que a microalbuminúria pode ser utilizada como um novo marcador não invasivo para o diagnóstico precoce de hipertensão arterial e de glomerulopatia esquistossomótica.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, microalbuminúria, cistatina C, creatinina, taxa de filtração glomerular.

Abstract

Schistosomiasis is a debilitating chronic disease that affects nearly 240 million people around the world and another 700 million live in endemic areas in developing countries, representing a serious public health issue. In 2009, there were 6,780,683 confirmed cases of the disease in Brazil. Chronic schistosomiasis can lead to severe hepatic inflammatory processes, and trigger kidney dysfunction and cellular damage, including an increase of oxidative stress and endothelial dysfunction. This contributes to the appearance of microalbuminuria, a loss of proteins that may serve as an early predictor of cardiovascular and kidney diseases. This study investigated the occurrence of microalbuminuria in 130 patients with hepatosplenic or hepatointestinal schistosomiasis, and its correction with the increase of pressure levels. Kidney function was also evaluated using biomarkers (Cystatin C / Creatinine) and estimated through the measurement of the glomerular filtration rate. The values obtained were compared

with 40 healthy persons (Control Group) from the same social classes. Finally, the study investigated – in rats infected by the *Schistosoma mansoni* parasite – the elevation of arterial pressure, the occurrence of proteinuria, kidney oxidative stress and hepatic oxidative stress. From the 130 patients (*Schistosoma mansoni* group) evaluated, 14.6% (11 men and 8 women) presented microalbuminuria (values between 30 and 300 mg / g of creatinine) in comparison to the Control Group, which showed only 5% (one man and one woman) as having microalbuminuria. From the 19 patients who presented microalbuminuria, 15 had hepatosplenic schistosomiasis, and 4 had hepatointestinal schistosomiasis. The kidney glomerular filtration rate and the arterial pressure increased in the *Schistosoma mansoni* group in relation to the Control Group. The result obtained from the evaluation of the glomerular filtration rate with serum Cystatin C, was higher than that obtained with serum Creatinine. In the study carried out with animals, the rats infected by the *Schistosoma mansoni* parasite had an increase in arterial pressure and loss of protein in the urine, compared with the Control Group. The animals that were not infected with the *Schistosoma mansoni* parasite and that were not treated with a sodium overload, did not have proteinuria or an increase in the pressure levels. All the results obtained suggest that microalbuminuria may be used as a new non-invasive marker for early diagnosis of arterial hypertension and schistosomal glomerulopathy

Key Words: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, microalbuminuria, cystatin C, creatinine, glomerular filtration rate.

Capítulo 1

1 Introdução

A esquistossomose é um sério problema de saúde pública que afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e outros 700 milhões vivem em áreas endêmicas de países em desenvolvimento, que dispõem de escassos recursos para combater a doença e desenvolver políticas públicas que o controle efetivo da doença. Somente na África Subsaariana há dados que documentam 200 mil mortes por ano em função da parasitose. A proliferação da doença se dá em parte pela migração de pessoas contaminadas, oriundas de áreas endêmicas para áreas indenes, onde o saneamento básico é precário (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

No Brasil, os dados são alarmantes, em 2009 a população infectada pelo parasita *mansoni* chegou a 6.780.683, o que reflete que uma média nacional de 0,07% da população brasileira está infectada pelo parasita. Para se ter uma dimensão exata do problema, apenas 30.397 pessoas foram tratadas em 2009 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A outra parte, não sabe que tem o problema ou não teve a devida orientação para buscar o serviço de saúde, ou ainda, não dispõe do serviço de atendimento especializado.

A transmissão da esquistossomose em Pernambuco é endêmica em 102 dos 186 municípios do estado, principalmente na Região Metropolitana, Zonas da Mata e Litoral. As prevalências mais altas são encontradas em localidades dos municípios das bacias do Capibaribe, Uma, Sirinhaém, Ipojuca, Jaboatão e Goiana. A prevalência média em 2010 foi 7,9 em 142.090 pessoas examinadas (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2010). Todos estes municípios têm grande circulação de pessoas e curiosamente, todos têm

problemas de infraestrutura como a deficiência de saneamento básico (MINISTÉRIO DAS CIDADES, 2012).

A forma de ocupação desordenada de ambientes urbanos, principalmente nas grandes cidades brasileiras é um grande desafio para as autoridades sanitárias, gerando novos problemas de saúde e ampliando a demanda assistencial dos serviços. Ambientes sem saneamento básico ainda são uma realidade de muitas áreas de grande concentração populacional. Estes locais, quase sempre estão localizados na periferia de grandes centros urbanos e facilitam a disseminação de doenças infecto-parasitárias como a esquistossomose (GRAY et al., 2010).

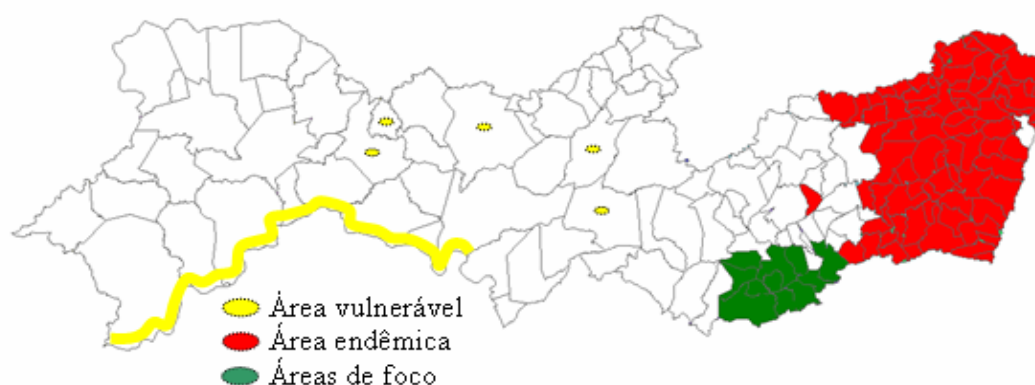
O estado de Pernambuco possui a 5ª maior região metropolitana do Brasil, com uma população estimada em cerca de 3.883.322 habitantes. Somente na Capital, Recife são 1.555.039 habitantes, segundo dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no Diário Oficial da União em 31 de agosto de 2012.

Em números, o percentual de habitantes que possui água tratada na Cidade de Recife é de 90,6 % e de esgoto tratado o número é de 37,3 %. Em outros municípios da Região Metropolitana a situação ainda é pior, a Cidade de Olinda tem uma população de 377. 779 habitantes. A população que recebe água tratada é de 85,8 % e apenas 34 % com acesso ao esgoto tratado. O pior índice das cidades que compõe a Região Metropolitana de Recife é do Município de Jaboatão dos Guararapes. Com uma população estimada em 644.620 habitantes, o número de pessoas com acesso a água tratada é de 56,8 % e de acesso a esgoto tratado chega ao alarmante índice de 7,5 %. Outros municípios da mesma região não fogem a esta realidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011).

Todos estes dados fazem de Pernambuco o segundo Estado Brasileiro de maior prevalência da esquistossomose mansônica e o que apresenta o maior número de casos da forma grave, a hepatoesplênica, e de mortalidade. A população exposta ao risco de infecção é de aproximadamente quatro milhões de habitantes, o que representa 47% da população do Estado (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Num estudo em escolares de 9 a 12 anos, dos 43 municípios da Zona da Mata, encontrou uma prevalência média de 14,4%. Em 25,6% dos municípios, a prevalência esteve acima de 20% e foram considerados de grande risco de morbidade, ou seja, de aparecimento de casos graves, e em 33% a prevalência esteve entre 10 e 20%, áreas consideradas de grande risco para transmissão e moderado para morbidade (BARBOSA et al., 2006).

A seguir, um mapa do estado de Pernambuco mostra áreas onde a população está exposta e o risco de infecção. A área em vermelho é endêmica e corresponde Recife e Região Metropolitana. Em amarelo, são as áreas vulneráveis e em verde são as áreas de foco da doença.

Figura 1. Mapa da esquistossomose no Estado de Pernambuco – PE.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2011

Estudos tem relatado a esquistossomose como um problema de saúde de grande importância sanitária e com opiniões diferentes de pesquisadores e especialistas no controle

da doença. Em 1919 um estudo publicado por Annon, mostrava a preocupação com a erradicação e o controle da doença. Hoje, quase um século depois a discussão sobre o controle da esquistossomose continua (GRAY et al., 2010; ROLLINSON et al., 2013).

A epidemiologia da esquistossomose preocupa e exige ações multiprofissionais no âmbito da saúde pública, o impacto sobre a prática nefrológica das muitas parasitoses endêmicas em regiões tropicais e subtropicais são de grande importância clínica (BARSOUM, 2004).

Atribuir a expansão da esquistossomose à migração de pessoas infectadas para áreas onde não há registros da doença e à dispersão dos hospedeiros intermediários é uma interpretação distorcida da realidade. É preciso levar em consideração os condicionantes do evento migratório, como os componentes sociais, econômicos e comportamentais (GRAY et al., 2010). A proliferação da esquistossomose exige ambientes com águas contaminadas e que circulem por esses ambientes, hospedeiros intermediários e definitivos para disseminarem a doença (GRYSEELS, 2012).

Sem tratamento a esquistossomose pode evoluir para a fase crônica, aí então surgem problemas associados como a diminuição da capacidade das pessoas para o trabalho e outras complicações como o surgimento de formas mais graves da doença (hepatoesplênica ou hepatointestinal) com graus variados de fibrose (I-D fibrose central, I-E fibrose avançada e II-F fibrose muito avançada) na classificação de (RICHTER et al., 2001a).

O envolvimento renal na esquistossomose mansônica, considerado como uma dessas complicações pode trazer uma evolução complexa da helmintíase, ampliando substancialmente o custo socioeconômico da doença (BARSOUM, 2004). Em 1999, Barsoum afirmava que apesar de uma epidemiologia que preocupava e exigia ações multiprofissionais no âmbito da saúde pública, o impacto sobre a prática nefrológica das

muitas parasitoses endêmicas em regiões tropicais e subtropicais não era devidamente considerado. Ao que parece, o descaso com as complicações renais advindas da esquistossomose, 12 anos após essa constatação, ainda é uma realidade (BARSOUM, 2004, 1999).

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

Todos esses dados relacionados à esquistossomose e todo o contexto que envolve esta patologia, nos remetem a pensar em concentrar os estudos que busquem alternativas tanto para o controle da doença, bem como desenvolver pesquisas no campo biotecnológico para reduzir os impactos causados pela doença e suas complicações. Neste sentido, é de particular importância pesquisar as complicações e comorbidades associadas à EHE e EHI, como por exemplo, o surgimento de microalbuminúria, elevação da pressão arterial, alterações na função renal com proteinúria oriundas da nefropatia esquistossomótica, além do aumento do estresse oxidativo em órgãos como o fígado e rim em função do processo infeccioso sistêmico causado pela esquistossomose.

Esse conjunto de situações influenciadas pela esquistossomose contribuiu para o desenvolvimento desta pesquisa, com os seguintes objetivos:

1.1 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a microalbuminúria como preditor de doença cardiovascular e renal em pacientes e em um modelo experimental esquistossomóticos.

Objetivos específicos

1º. Investigar em pacientes portadores de fibrose hepática/perportal esquistossomótica a ocorrência de microalbuminúria e a filtração glomerular e correlacionar com níveis de pressão arterial.

2º. Avaliar a taxa de filtração glomerular de pacientes portadores de fibrose hepática/perportal esquistossomótica utilizando como biomarcadores a Creatinina e a Cistatina C.

3º. Investigar em ratos infectados com *Schistosoma mansoni*, submetidos ou não a uma sobrecarga de sódio:

- a) a microalbuminúria;
- b) os níveis pressóricos;
- c) o estresse oxidativo renal;

2 Revisão de literatura

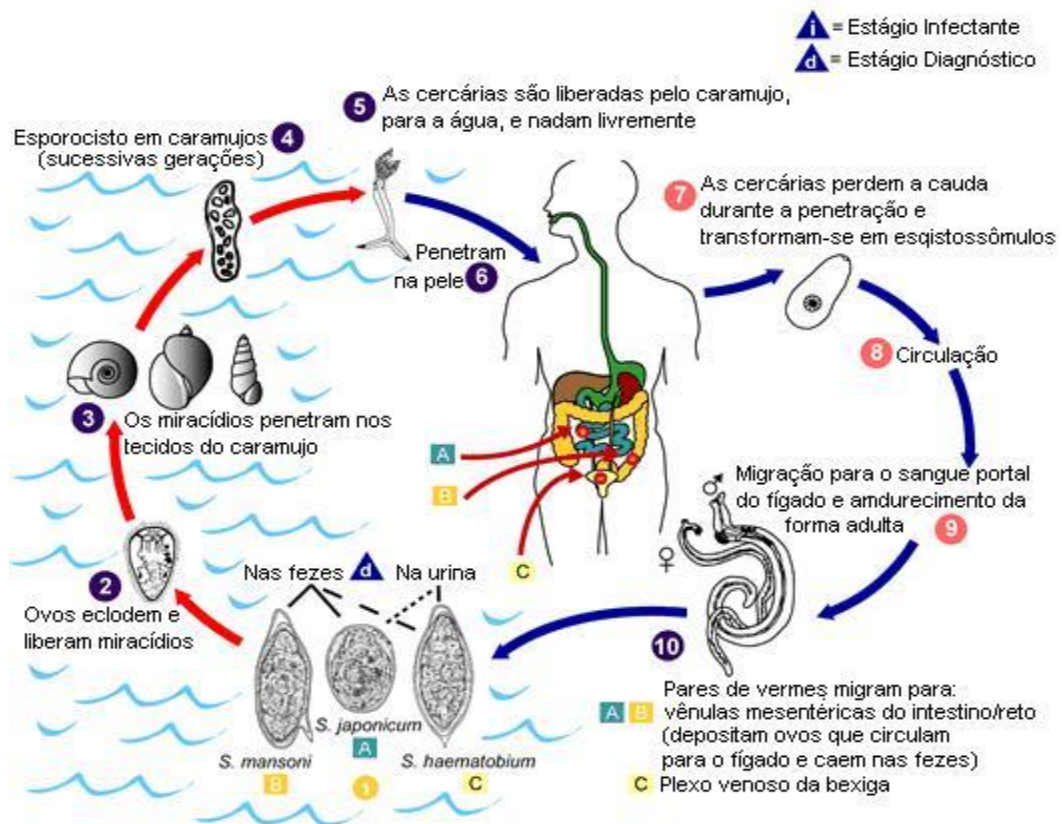
2.1 Esquistossomose

O *Schistosoma mansoni* é um macroparasita delgado e de coloração branca. Tem um ciclo de vida com várias transformações, tendo o homem como hospedeiro definitivo e o caramujo como hospedeiro intermediário. O macho adulto possui uma fenda denominada canal ginecóforo, onde carrega a fêmea junto de si. Habitam e colocam seus ovos preferencialmente no sistema porta, ramos das veias mesentéricas e plexo hemorroidário superior. Os ovos são eliminados nas fezes. Em contato a água os ovos eclodem e liberam larvas denominadas miracídeos, que infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria* que em água doce. No caramujo os miracídeos se transformam em esporocistos, que, por poliembrionia se transformam em cercárias. As cercárias são liberadas pelos caramujos na água cerca de quatro semanas após a infecção. (NEVES et al., 2011; RAY, 2011).

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* ocorre através da pele, por penetração da cercaria quando o homem entra em contato com água contaminada. No hospedeiro definitivo (homem) o parasita sofre várias alterações na sua morfologia, e se transforma em esquistossômulo. Cerca de três dias depois o esquistossômulo entra na circulação sanguínea e linfática, migrando para os pulmões. A partir da segunda semana de infecção, chega até as artérias mesentéricas, esplênicas e sistema porta hepático, onde se torna adulto em até quatro semanas depois. Nesta fase pode ocorrer febre, linfadenopatia e aumento do baço. (NEVES et al., 2011; PRATA & COURA, 2008).

A figura 2, demonstra em um desenho esquemático o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* nas diversas fases do seu ciclo evolutivo.

Figura 2. Ciclo de vida do parasita *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention, CDC 2012

Os adultos vivem em cópula permanente, fixados à parede dos vasos sanguíneos, depois de um a três meses iniciam a ovoposição. Os ovos do *Shistosoma mansoni* são espiculados, tem maior facilidade em atravessar a parede dos vasos entram nos tecidos, quando perfuram a estrutura da parede colônica, aparecem nas fezes. Os ovos contêm formas larvárias imaturas de miracídeos (fêmea ou macho), que são liberadas na água quando a casca se rompe cedendo à pressão osmótica. Os miracídeos penetram no caramujo *Biomphalaria sp*, que é o hospedeiro intermediário, onde se reproduzem assexuadamente. Entre três e cinco semanas surgem os esporocistos e então as cercarias, que penetram no hospedeiro final (o homem), fechando o ciclo de vida (STAVITSKY, 2004; NEVES et al., 2011).

2.2 Esquistossomose mansônica aguda e crônica

A fase aguda da esquistossomose: pode ser assintomática, se houver contato mínimo com as cercárias. Em caso de superexposição os sintomas tendem a ser mais intensos, ocorrendo sudorese, calafrios, cefaléia, dores abdominais, diarreia, anorexia, emagrecimento, discreta alteração de enzimas hepáticas. Esta sintomatologia da fase aguda diminui gradativamente com duração de até 120 dias. A partir daí, pode ter início a fase crônica da esquistossomose (RAY, 2011; VAN DER WERF; BORSBOOM; DE VLAS, 2003).

A fase crônica da esquistossomose: é comum ocorrer a formação de granuloma em torno dos ovos do parasita. Inicialmente, a reação inflamatória faz surgir ao redor dos ovos do parasita, um número elevado de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, dando um aspecto de abcesso, resultando em massas sinciciais multinucleadas. Muitos macrófagos se transformam em fibroblastos, aumentando a espessura do granuloma. A medida que aumentam os fibroblastos, o granuloma esquistossomótico se apresenta como uma cicatriz fibrosa (RAY, 2011).

A fase crônica pode apresentar grandes variações clínicas em três formas distintas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (RAY, 2011). Na forma intestinal é comum ocorrer desconforto abdominal, com pequenos surtos diarreicos, intercalados com evacuações normais e quadros de flatulência. O número de pessoas com esquistossomose hepatointestinal que evoluem para a forma hepatoesplênica pode chegar a 10%. Pode ocorrer fibrose periportal e doença hepática crônica. (ANDRADE, 2005; BINA; PRATA, 2003).

2.3 Esquistossomose hepatointestinal (EHI)

A forma hepatointestinal da esquistossomose não se apresenta com manifestações clínicas muito evidentes. Isto dificulta o diagnóstico e grande parte dos portadores são

assintomáticos ou com sintomatologia predominantemente intestinal, com dor e desconforto abdominal, intolerância a determinados tipos de alimentos, náuseas e vômitos (RAY, 2011). Há pessoas infectadas que relatam sonolência após as refeições, sudorese, redução do peso e sonolência após as refeições. Há casos com lesões intestinais (diarreia mucosanguinolenta, tenesmo, fibrose de alça retossigmoide) mais evidentes, além fibrose periportal (NEVES et al., 2011; RAY, 2011). Tais alterações acabam sendo confundidas com aquelas encontradas na forma hepatoesplênica da esquistossomose, a qual pode ser diferenciada pelo aumento do fígado e do baço (RAY, 2011; PRATA & COURA, 2008).

Cerca de 90% das pessoas infectadas pela esquistossomose apresenta a forma mais leve da doença, com formação de granulomas nodulares encontrados isoladamente em áreas do tecido hepático. Entretanto a maioria dos casos é benigna com relato de dores abdominais e diarreia mucosanguinolenta, devido a passagem de ovos do parasita para a luz intestinal. Como esses ovos são espiculados, acabam causando pequenas lesões com presença de hemorragia e edema. (NEVES et al., 2011; PORDEUS et al., 2008; ANDRADE, 2008).

2.4 Esquistossomose hepatoesplênica (EHE)

Na forma hepatoesplênica da esquistossomose ocorre a deposição de ovos do parasita em grande quantidade nos espaços portais, desencadeando uma resposta inflamatória severa com formação de granulomas. Há neoformação de tecido conjuntivo-vascular em torno dos vasos portais com diminuição da luz da veia porta, causando obstrução em muitos casos (NEVES, 2011; ANDRADE, 2004). Surgem então hepatoesplenomegalia, hipertensão portal e formação de varizes no esôfago. Uma característica da EHE, cujo tratamento é paliativo e não reverte o quadro evolutivo da doença (RAY, 2011; MAIA et al., 2007; RICHTER, 2003; VEZOZZO et al., 2006).

A hipertensão portal ocorre devido a obstrução da veia porta, desencadeado pela fibrose periportal, aumento de fígado e baço. É uma das consequências mais graves da infecção causada pelo *Schistosoma mansoni*, sendo responsável pela morbimortalidade de muitas pessoas infectadas pelo parasita. O espessamento periportal detectado em um exame de ultrassonografia se correlaciona com a fibrose periportal encontrada nas biópsias em 100% dos casos. A progressão da doença é clinicamente insidiosa e silenciosa. A ultrassonografia (US) permite avaliar a extensão e a evolução da doença após seu tratamento (RICHTER et al., 2001a; SOUZA et al., 2011).

Um dos exames mais utilizados para avaliar o grau de fibrose periportal induzida pela esquistossomose é a ultrassonografia. Uma vez detectada a fibrose é preciso determinar o seu grau através da classificação de Niamey, que consiste em graus variáveis de fibrose de acordo com o local e extensão: I-D: fibrose central, grau I-E fibrose avançada e grau II-D fibrose muito avançada (RICHTER et al., 2001a). Níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) já foram utilizados como um marcador alternativo para determinar o grau e padrão de fibrose periportal na Esquistossomose (CORREIA et al., 2009).

3. Albumina

A albumina é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos e massa molecular de 66 KDa. Estruturalmente a molécula madura está disposta na circulação numa série de α -hélices, que se agrupam para formar 2 subdomínios A e B (figura 3), dos quais três pares idênticos destes subdomínios se unem formando a albumina (GHUMAN et al., 2005; NICHOLSON et al., 2000).

A albumina possui características específicas que são relevantes para a estrutura e função: 18 resíduos de tirosina, 6 resíduos de metionina, 1 resíduos de triptofano, 59 resíduos

de lisina, 1 resíduo de cisteína (Cys-34), e 17 pontes dissulfetos. A cisteína livre tem um sulfidril reduzido que é responsável por mais de 75% dos grupos tiol no plasma. O tiol está envolvido em várias reações bioquímicas que inativam as espécies reativas de oxigênio, o que confere à albumina um importante papel antioxidante para no organismo (WONG, 2007).

Figura 3. Molécula de albumina e seus subdomínios.

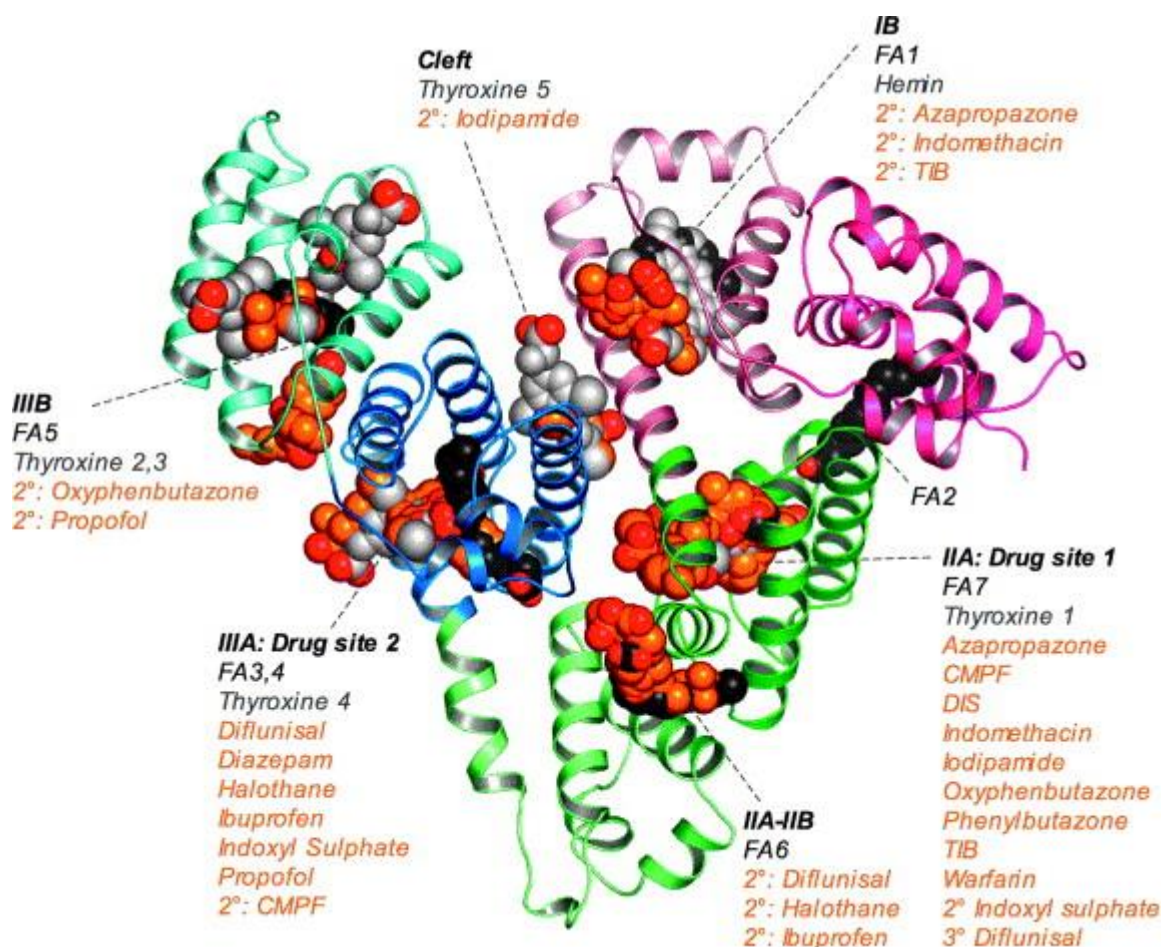


Figura 3. Resumo da capacidade de ligação da albumina sérica humana segundo estudos cristalográficos no esquema representado. Os ligantes são representados na figura acima. Os átomos de oxigênio estão na cor vermelha, todos os outros átomos que no caso são: ácidos graxos (ácido mirístico), ligantes endógenos (hemina, tiroxina) e drogas são coloridos cinza-escuro, cinza claro e laranja, respectivamente (GHUMAN et al., 2005).

A albumina tem uma concentração plasmática típica de 35 - 45 g/l, que representa 30 a 40% da albumina sintetizada no fígado. O restante encontra-se distribuído entre os músculos e

a pele. Em indivíduos saudáveis a albumina é a proteína mais abundante no plasma, representando entre 55-60% da proteína medida no soro, e a concentração sérica depende de sua taxa de síntese, degradação e da sua distribuição corresponde à principal fração das proteínas totais presentes no plasma. É a proteína mais abundante no meio extracelular (DUARTE, 2007; WONG, 2007). Os níveis séricos de albumina estão relacionados ao aumento da morbidade, (período maior de internação para tratamentos e cicatrização comprometida) e da mortalidade (GAW, 2001). Os valores de referência em adultos são descritos como normal: acima de 3,5 g/dL, depleção leve: de 3 a 5 g/dL, depleção moderada: de 2,4 a 2,9 g/dL e depleção grave: menor do que 2,4g/dL (CUPPARI, 2005).

3.1 Síntese de albumina

A síntese inicia no núcleo celular, onde os genes são transcritos para o ácido ribonucleico (mRNA). O mRNA é secretado para o citoplasma, onde se liga aos ribossomos, formando polissomos que sintetizam uma extensão de 24 aminoácidos. A extensão de aminoácidos sinaliza a inserção da pré-albumina na membrana do retículo endoplasmático. Uma vez dentro do lúmen do retículo, 18 aminoácidos da extensão são clivados, formando a pró-albumina com uma extensão de seis aminoácidos remanescentes. A pré-albumina é a principal forma intracelular de albumina e é exportada para o complexo de golgi, onde a extensão de seis aminoácidos é removida antes da secreção da albumina pelo hepatócito (JOHNSON et al., 2008).

A albumina entra no espaço intravascular de duas maneiras, na primeira, atinge o espaço via sistema linfático hepático, movendo-se para os ductos torácicos; a segunda via passa diretamente dos hepatócitos para os sinusoides, após atravessar o espaço de Disse. O fígado é o único sítio de produção de albumina, fornecendo 12 a 15 g/dia (MINCIS, 2008), a

uma taxa de 197 mg/kg de peso corporal/dia ou 12-25g de albumina por dia. Não é armazenada pelo fígado, mas secretada para a circulação portal logo que é produzida. Fisiologicamente, o fígado pode aumentar a síntese de albumina em apenas 2-2,7 vezes acima do normal. Alguns fatores são necessários para a síntese normal de albumina, como uma nutrição adequada, secreção hormonal e ambiente osmótico.

A pressão osmótica coloidal do fluido intersticial que banha o hepatócito é o maior regulador da síntese de albumina. Entre os fatores que podem influenciar a sua síntese estão: o trauma, a septicemia, doenças hepáticas, diminuição do hormônio de crescimento e de corticosteroides, jejum e depleção de proteínas (WONG, 2007; NICHOLSON et al., 2000).

A avaliação da albumina é um bom parâmetro para a avaliação da função de síntese hepática do fígado. Sua concentração pode diminuir na doença hepática crônica. É também um dos critérios de avaliação da gravidade da doença em pacientes cirróticos. O intervalo de tempo para repetir a dosagem deve ser de no mínimo 20 dias (MINCIS, 2008).

3.2 Degradação da albumina

Após secreção no plasma, as moléculas de albumina passam para o espaço tissular e retornam ao plasma via ducto torácico. Ainda não está bem elucidado sobre quantas vezes a albumina exerce suas funções antes da degradação por cerca de 20 dias após ser excretada, razão pela qual não há redução de seus níveis na insuficiência hepática aguda nem na hepatite aguda de qualquer etiologia. Estudos sugerem que a albumina é degradada aleatoriamente no endotélio dos capilares, na medula óssea e nos sinusoides hepáticos, não havendo diferenciação entre moléculas novas e velhas (JOHNSON et al., 2008; MINCIS, 2008).

3.3 Função da albumina

A principal função fisiológica da albumina é manter o volume intravascular a pressão coloidosmótica, gerada pelas proteínas no plasma sanguíneo, além de ser o principal modulador de distribuição de fluídos entre os compartimentos do organismo. A albumina ainda desempenha várias outras funções, como o transporte de substâncias endógenas como os aminoácidos, ácidos graxos, bilirrubina e outros metabólitos e substâncias exógenas como drogas e produtos tóxicos (DUARTE, 2007; EVANS et al., 2005; MENDEZ et al., 2005; WONG, 2007).

Tem uma capacidade extraordinária de ligação com uma variedade de moléculas hidrofóbicas, ácidos graxos, bilirrubina, hemina, tiroxina e esteroides, sendo o transportador destes compostos. Afeta as propriedades farmacocinética de muitas drogas, fornece a modificação metabólica de alguns ligantes, torna inofensivas potenciais toxinas. (ASCENZI; FASANO, 2009, 2010; BAKRIS et al., 2010; BERTUCCI; PISTOLOZZI; DE SIMONE, 2010; CURRY, 2002, 2009; GHUMAN et al., 2005; YANG et al., 2007). Além de propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e efeito estabilizador sobre o endotélio vascular (COMHAIR; THOMASSEN; ERZURUM, 2000; EVANS; MAJID; EPPEL, 2005; HATI, 2003; KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; WACHTELL et al., 2003; WONG, 2007).

Na manutenção da pressão osmótica coloidal, a albumina parece circular do intravascular para os espaços extravasculares, e a taxa de evasão transcapilar é determinada: pelos capilares e concentrações intersticiais de albumina livre, pela permeabilidade microvascular para o movimento da albumina, pelo movimento de solutos e de solventes e pela carga elétrica transcapilar. Em pacientes com hipoalbuminemia (especialmente quando associada com a inflamação ou sepse), cujos capilares são conhecidas por ser hiper permeável

e permitir o vazamento de albumina para o espaço intersticial atrai água e produz edema (WONG, 2007).

A albumina é uma proteína transportadora versátil para a segmentação de várias drogas e para melhorar o perfil farmacocinético dos medicamentos peptídeos ou à base de proteínas. Tem uma forte carga negativa, mas é reversível e se liga fracamente para cátions e ânions, o que pode influenciar a permeabilidade capilar. Assim, ela funciona como uma molécula de transporte para um grande número de metabolitos (KRATZ, 2008; QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

Em relação às propriedades antioxidantes, a albumina é a principal fonte de tióis extracelular, que são grupos sulfidrílicos catadores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, a albumina pode limitar a produção de espécies oxidativas reativas através de ligação de cobre livre, um íon conhecido por ser particularmente importante na aceleração da produção de radicais livres (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005; QUINLAN et al., 1998).

Quanto à estabilização endotelial, a albumina tem a capacidade de reduzir a lesão do endotélio, causada por espécies reativas de oxigênio e pela retenção de compostos nitrogenados, o que significa estabilizar e auxiliar na manutenção da permeabilidade capilar. Interfere na adesão dos neutrófilos ao endotélio capilar, reduzindo a inflamação e auxiliando na manutenção da integridade endotelial (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

A albumina sérica também é utilizada como biomarcador importante de várias doenças, incluindo o câncer, a artrite reumatóide, a isquemia, pós menopausa, síndrome nefrótica, obesidade severa aguda, doença do enxerto contra hospedeiro em pacientes transplantados e de doenças que necessitam de monitorização da glicemia como o diabetes

mellitus e a nefropatia diabética. (EIJKELKAMP et al., 2007; GUPTA; LIS, 2010; HATI, 2003; KOGA et al., 2010; SBAROUNI; GEORGIADOU; VOUDRIS, 2011).

Na prática clínica, uma série de estudos recentes tem relatado que a albumina tem sido amplamente utilizada no tratamento de várias doenças (LEE, 2012), incluindo hipovolemia, choque, queimaduras, perda de sangue em cirurgias, trauma, hemorragia, circulação extracorpórea, síndrome da angústia respiratória aguda, hemodiálise, insuficiência hepática aguda, doença hepática crônica, suporte nutricional e na hipoalbuminemia (BERNARDI et al., 2012; DELANEY et al., 2011; LIBERATI et al., 2006; ROBERTS et al., 2011). Recentemente, tem sido relatadas aplicações biotecnológicas de albumina sérica humana, incluindo a produção de biomateriais, adesivos e selantes cirúrgicos e biocromatografia ((BERTUCCI; PISTOLOZZI; DE SIMONE, 2010; FURUKAWA et al., 2011; HATI, 2003; KOMATSU et al., 2011).

3.4 Microalbuminúria e doença cardiovascular

Microalbuminúria, presença de 30 – 300 mg/dL de albumina na urina, tem prevalência elevada em pacientes hipertensos e diabéticos, no entanto pode ocorrer entre 5 e 7% de indivíduos jovens e saudáveis, (BERTUCCI; PISTOLOZZI; DE SIMONE, 2010; DE ZEEUW; PARVING; HENNING, 2006; HILLEGE et al., 2001; YUYUN et al., 2004) e tem sido correlacionada com o desenvolvimento tardio de doenças cardiovasculares, inclusive hipertensão arterial (MOGENSEN; CHRISTENSEN, 1984; YUYUN et al., 2003). Assim, a microalbuminúria não representa apenas um marcador de doença renal, ela tem sido apontada como um fator preditivo de doenças cardiovasculares e de hipertensão arterial (DE ZEEUW; PARVING; HENNING, 2006).

A microalbuminúria tem prevalência elevada em pacientes com diabetes mellitus tipo II (MOGENSEN, 1984) e tem sido amplamente reconhecida como um preditor para doença cardiovascular (DCV) ao longo dos últimos 10 anos (KARALLIEDDE; VIBERTI, 2005; WEIR, 2007). Um estudo recente mostrou que a microalbuminúria está associada a lesões glomerulares, pré-lesão vascular glomerular e inflamação dos nefrons justamedulares em ratos espontaneamente hipertensos (NAGASAWA et al., 2012).

A presença de microalbuminúria independentemente da causa, aumenta o risco de doenças cardiovasculares, principalmente quando associada à presença de fatores de risco conhecidos como dislipidemia, hipertensão e diabetes (EIJKELKAMP et al., 2007; FORMAN; BRENNER, 2006). Ensaios clínicos têm demonstrado que a redução da microalbuminúria melhorou significativamente os resultados de DCV em indivíduos albuminúricos (DE ZEEUW et al., 2004; HILLEGE et al., 2002; IBSEN et al., 2006).

Todos estes estudos demonstram que a microalbuminúria pode repercutir em distúrbios cardiovasculares e renais, além de diabetes mellitus tipo II (DE ZEEUW; PARVING; HENNING, 2006; KARALLIEDDE; VIBERTI, 2005; MOGENSEN; CHRISTENSEN, 1984; WEIR, 2007). A albuminúria foi associada à lesão de nefrons Justamedulares, lesões nas artérias da medula espinhal e incidência dos casos de acidente vascular cerebral (AVC). Esta afirmação é sustentada pelo fato de que, a espessura da parede da arteríola glomerular do nefron justamedular é aumentada quando está presente a microalbuminúria, o que indica que a excreção de albumina está predominantemente nos nefrons justamedulares lesionados (NAGASAWA et al., 2012).

A Pressão capilar glomerular é normalmente mantida a uma constante de cerca de 50 mmHg em ambos os glomérulos corticais externos e justamedulares. Os vasos pré-glomerulares, especialmente as arteríolas aferentes, são responsáveis pela regulação da

pressão capilar glomerular. Os glomérulos corticais podem reduzir a pressão arterial efetiva de cerca de 90 mmHg na artéria arqueada para 50 mmHg, a uma distância relativamente longa. Em comparação, o nefron justamedular realiza esta redução na pressão sanguínea em uma distância menor. Por conseguinte, a arteríola aferente da artéria justamedular é suscetível à tensão crônica com exposição a altas pressões e é sensível à elevação precoce da pressão arterial (ITO et al., 2009).

Mesmo com tantos trabalhos realizados para determinar o seu mecanismo as conclusões tiradas a partir desses estudos permanecem controversas (THOMAS, 2011).

Em relação à esquistossomose, as lesões dos capilares glomerulares que podem sugerir o aumento da pressão, provem da resposta imunológica associada à infecção pelo *schistosoma mansoni*. Essa afirmação é sustentada pela deposição de imunocomplexos específicos, limitada inicialmente a área mesangial, por isso é chamada de glomerulonefrite mesângio-proliferativa. Mas pode resultar no acometimento mais difuso do glomérulo, envolvendo não somente o mesângio, mas também a parede capilar e especificamente sua face subendotelial, com forte reação exsudativa, estimulando a proliferação das células residentes, em particular as células mesangiais (BARROS et al., 2012; BARSOUM, 1993, 1999).

Do ponto de vista anatomopatológico, as alterações desencadeadas e observadas no processo inflamatório glomerular se assemelham as da glomerulonefrite focal e segmentar, idiopática ou primária (NUSSENZVEIG et al., 2002). Isto sugere que essa lesão é uma consequência da redução do número total de nefrons, destruídos pela inflamação prévia, persistente, que gerou os tipos histológicos descritos. Este processo inflamatório pode desencadear mudanças hemodinâmicas importantes que resultam no aumento da hipertensão intracapilar glomerular, os nefrons remanescentes sofrem um processo de esclerose progressiva (BARROS et al., 2012).

A deposição de imunocomplexos estimula a proliferação de células mesangiais, determinando o aumento no volume do tufo glomerular (glomerulonefrite mesângio-proliferativa) O que pode dar origem a proteinúria (BARROS et al., 2012; MARTINELLI et al., 1992). Neste sentido, a glomerulopatia esquistossomótica tem proteinúria de origem glomerular, em função da resposta imunológica, seja em níveis nefróticos ou não nefróticos (BARSOUM, 2004; SOUZA et al., 2011).

As glomerulopatias associadas à esquistossomose apresentam um espectro amplo de manifestações clínicas que se estendem a partir de uma microalbuminúria assintomática até o estágio final da doença renal. Isto levou a uma classificação clínico patológica de 5 tipos de glomerulonefrites associadas a esquistossomose, aprovadas pela Associação Africana de Nefrologia em 1992 e conhecida como AFRAN. Esta classificação possibilitou diferenciar a doença glomerular associada ao shistosoma em 5 padrões histológicos (BARSOUM, 2004).

Classe I glomerulonefrite mesangial, como deposição de complexos imunes contendo antígenos esquistossomóticos, IgM e C 3 (SOBH et al., 1988). Classe II glomerulonefrite exsudativa, com muitos neutrófilos, monócitos e eosinófilos que invadem o mesângio (BASSILY et al., 1976). Classes III e IV apresentam proteinúria, geralmente dentro da gama nefrótica, embora subnefrótica, proteinúria ocorre em 10% a 20% dos pacientes, ocorrendo na maioria dos pacientes com doença progressiva. Ambos são encontrados principalmente com *Shistosoma mansoni* (BARSOUM, 1993a). Classe V - resposta generalizada à inflamação crônica, com proteinúria e insuficiência renal progressiva (MARTINELLI et al., 1992).

4. Avaliação da função renal e biomarcadores

A medida da função renal é essencial para identificar distúrbios renais que possam reduzir a taxa de filtração glomerular (TFG). É muito utilizada na prática clínica para se

avaliar o funcionamento renal (Roos, 2007; Vaisbich, 2003), além de alternativa para minimizar a insuficiência renal aguda (IRA) com sua prevenção e diagnóstico precoce. A TFG é amplamente aceita como a melhor forma de avaliar a função renal em indivíduos saudáveis ou doentes e geralmente é mensurada em laboratório, utilizando como parâmetro um biomarcador glomerular (MADERO; SARNAK; STEVENS, 2006; MARTINS et al., 2003; ROSS et al., 2007).

Para um biomarcador ser ideal na avaliação da TFG, deve ser totalmente filtrado pelos rins, permeável à barreira glomerular e não deve ser sintetizado ou degradado no organismo, nem secretado ou reabsorvido pelos túbulos renais (BAGSHAW; GIBNEY, 2008; HERRERO-MORÍN et al., 2007; VILHELMSDOTTER ALLANDER et al., 2012). A inulina, substância que preenche estes critérios é onerosa, de difícil aquisição e manipulação, sendo utilizada apenas em pesquisas ou centros altamente especializados (KIRSZTAJN, 2007; ROSS et al., 2007;).

Biomarcadores endógenos são de determinação menos complexa e oferecem resultados mais rápidos. Atualmente, a creatinina sérica é o marcador endógeno mais comumente utilizado na prática clínica, seja por meio de sua determinação sérica isolada ou em conjunto com a coleta de urina de 24 horas para a determinação da depuração de creatinina (VILHELMSDOTTER ALLANDER et al., 2012).

4.1 Creatinina

A concentração da creatinina plasmática, um derivado da creatina muscular, com massa molecular de 113 KDa (MADERO; SARNAK; STEVENS, 2006), está inversamente relacionada à TFG. Entretanto, muitos fatores limitam sua acurácia, uma vez que o seu nível sérico é proporcional à massa muscular e é influenciada pela idade e sexo (DEINUM;

DERKX, 2000). Isso favorece uma considerável variação intra e interindividual, justificando o nível plasmático mais elevado em adultos que em crianças e em homens que em mulheres, bem como um aumento significativo com o crescimento linear em crianças (BÖKENKAMP et al., 1998; HERGET-ROSENTHAL; BÖKENKAMP; HOFMANN, 2007).

Ao contrário, indivíduos que perdem massa muscular evoluem com redução na produção de creatinina e, conseqüentemente, em seu nível plasmático. Associado a isso, alguns fatores externos interferem em sua determinação analítica, entre os quais se citam outras substâncias endógenas (glicose, bilirrubinas, ácido úrico, triglicerídeos, cetonas e proteínas plasmáticas) e alguns medicamentos (cefalosporinas, sulfas e cimetidina), que inibem sua secreção tubular, elevando o nível sérico sem afetar a TFG (HOJS et al., 2006; MADERO; SARNAK; STEVENS, 2006).

Na prática clínica, o biomarcador mais utilizado para avaliar a função renal tem sido a creatinina sérica. Esta é liberada de forma relativamente constante no plasma e livremente filtrada pelos glomérulos, não é reabsorvida no túbulo proximal, nem metabolizada pelos rins (BAGSHAW; GIBNEY, 2008). Entretanto, apresenta diversas desvantagens na avaliação da função renal: sofre secreção tubular, levando a uma superestimativa da TFG em pacientes com função renal diminuída; quando avaliada através de depuração da creatinina endógena (DCE) é considerada pouco sensível (HERRERO-MORÍN et al., 2007), pois não possibilita a detecção de quedas de 50% e nem alterações rápidas na função renal. A coleta de urina de 24 horas é trabalhosa e acarreta erros; sua depuração, apesar de usada para avaliar a TFG, não é útil para definir o estágio exato da perda de função renal. (VAISBICH, 2003).

A análise da creatinina é ainda predominantemente dependente da reação original de Jaffé, a qual envolve um mecanismo de reação que não é completamente compreendido e

sofre muitas interferências analíticas, além de ser imprecisa e apresentar viés (KIRSZTAJN, 2007).

Portanto, é consenso da National kidney Foundation desde 2002, (LEVEY et al., 2003) indicar que a medida isolada da creatinina não é suficiente, nem a melhor forma de estimar a TFG. Para esta finalidade, podem ser utilizadas equações que levem em conta a creatinina sérica e algumas ou todas as seguintes variáveis: idade, sexo, raça e índice de massa corporal (IMC). As equações do estudo Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (RULE et al., 2004) e de Cockcroft-Gault provêm estimativas úteis da TFG em adultos. A equação do MDRD é superior à Cockcroft-Gault em pessoas com TFG menor que 90 mL/min/1,73m², por ser mais acurada e precisa, conforme já previamente determinado através da comparação com a depuração de 125I-iotalamato. Ela foi desenvolvida em indivíduos com doença renal crônica, não incluindo pessoas saudáveis (LEVEY et al., 1999, 2003).

Em pessoas normais, a equação do MDRD pode significativamente subestimar a TFG (LIN et al., 2003) e desta forma, não ser apropriada para determinar a prevalência da doença renal crônica (RULE et al., 2004). Além disso, permanecem questões sobre a possibilidade de generalização do uso da equação, porque ela não foi validada na nefropatia diabética, em pacientes com sérias comorbidades, ou em pessoas acima de 70 anos de idade. Contudo, devido às limitações desta equação, foi proposto um novo cálculo, o qual foi originado da avaliação de 580 indivíduos saudáveis e 320 com doença renal crônica.

Um estudo envolvendo pacientes diabetes mellitus tipo 1 proveu uma equação para estimar a TFG com iohexol, dependente de cistatina C, em indivíduos com níveis de creatinina dentro da faixa de normalidade, mas com função renal de normal a moderadamente (LEVEY et al., 2003) diminuída. Tem-se considerado em relação a equações preditoras da TFG o viés referente à falta de padronização na calibração dos ensaios de creatinina entre os

laboratórios de análises clínicas. Entretanto, mesmo reconhecendo e eliminando vieses de calibração, este procedimento não retifica o viés de seleção presente no estudo original do MDRD (CORESH et al., 2002).

4.2 Cistatina C

A cistatina C é uma proteína catiônica básica, não glicosilada de 120 aminoácidos, ponto isoelétrico 9,3 e um peso molecular de 13 KDa, pertence à família 2 das cistatinas (FILLER et al., 2005). Foi descoberta em 1961, como traço g numa banda eletroforética de fluido cerebrospinal, sendo também, no mesmo ano, identificada na urina. Em 1985, foi demonstrada, pela primeira vez, a forte correlação inversa da cistatina C sérica com a FG (NEWMAN, 2002). A partir desta época, tem havido um interesse crescente na cistatina C como um marcador da filtração glomerular, sendo atualmente um forte concorrente da creatinina.

É produzida a uma taxa constante por células nucleadas (MYERS et al., 2006) e não é alterada pela coexistência de processos inflamatórios e é razoavelmente constante. Parece ser a proteína mais investigada em fluidos biológicos humanos. O seu nível no plasma parece não variar de causas extra renais, o que a caracteriza como um marcador adequado da taxa de filtração glomerular (FILLER et al., 2005; MYERS et al., 2006).

A cistatina C é livremente filtrada pelos glomérulos devido ao seu baixo peso molecular, em combinação com uma carga elétrica positiva (CURHAN, 2005; DEINUM; DERKX, 2000) e é seguida por reabsorção tubular e degradação, resultando na excreção de uma pequena quantidade na urina. Não é secretada pelos túbulos renais e também não é reabsorvida de volta para o soro e, portanto, os seus níveis no soro reflete a quantidade de filtração glomerular (LEVIN, 2005). Estudos iniciais relataram que sua concentração sérica

independe da idade, sexo, dieta, massa muscular e peso corporal. (DHARNIDHARKA; KWON; STEVENS, 2002; SHIMIZU-TOKIWA et al., 2002). Dessa forma, não foi relatada diferença relevante entre os valores de referência para o sexo feminino e o masculino. Em crianças saudáveis, a concentração de cistatina C se estabiliza no segundo ano de vida e o valor de referência é idêntico ao dos adultos (FILLER et al., 2005; HERGET-ROSENTHAL; BÖKENKAMP; HOFMANN, 2007).

Atualmente, o método mais utilizado para mensurar a Cistatina C sérica, é o PENIA (particle-enhanced nephelometric immunoassay) feita no aparelho BNII, da Dade Behring. É automatizado, rápido e requer pequenas quantidades de soro (FILLER et al., 2005; MARTINS et al., 2003; NEWMAN, 2002; PRATES et al., 2007). Os valores de referência tem um intervalo entre 0,53 mg/l e 1,2 mg/l (FINNEY; NEWMAN; PRICE, 2000; UHLMANN et al., 2001).

Quanto a estabilidade da amostra, o fabricante recomenda que à temperatura ambiente é de 7 dias; a -20 °C, de 1 a 2 meses; - 80 °C, 6 meses. Além disso, resiste a um mínimo de 07 ciclos congelamento/descongelamento. Pode ser deixada sem separar do sangue por até 24 horas sem alteração da quantidade de cistatina C presente na amostra (PRATES et al., 2007; VISVARDIS et al., 2004; POGGIO; HALL, 2006).

5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a proteção antioxidante (extra e intracelular) do organismo. Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo que serve para designar os radicais livres derivados do oxigênio (superóxido, hidroxil) e também, não radicais derivados do oxigênio (peróxido de hidrogênio). As moléculas que contêm um ou mais elétrons não emparelhados tem alta

reatividade e podem reagir entre si ou a vários tipos de moléculas encontrados nas células, por isso são chamados radicais livres. Quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, forma-se um não radical (SHOJI; KOLETZKO, 2007; VALKO et al., 2007).

EROs de grande importância fisiológica são o ânion superóxido, superóxido de hidrogênio, radical hidroxila e o ácido hipocloroso. Essas substâncias podem ser produzidas por diferentes mecanismos, como isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos e macrófagos, ácidos graxos livres e metabolismo das prostaglandinas. podem reagir com quase todo tipo de molécula presente em células vivas, como lipídios, proteínas, polissacarídeos e o próprio ácido desoxirribonucleico (DNA) (SHOJI; KOLETZKO, 2007).

Há também fontes exógenas de oxidantes como a hiperóxia, que pode elevar os níveis da pressão parcial de oxigênio nos diversos tecidos do corpo e consequentemente aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (COMHAIR; THOMASSEN; ERZURUM, 2000). A fumaça do cigarro é outra fonte exógena de oxidante que contém muitos radicais livres e compostos orgânicos, como o superóxido e o óxido nítrico. A inalação da fumaça do cigarro cria mecanismos endógenos como a acumulação de neutrófilos e macrófagos, os quais podem aumentar a lesão oxidante (ASANO et al., 2012). Outras fontes de oxidante exógeno incluem a radiação ionizante e a exposição ao ozônio (BIRBEN et al., 2012).

Normalmente, EROs são produzidas por organismos vivos, como um resultado do metabolismo celular. Em concentrações baixas a moderadas, elas funcionam em processos celulares fisiológicos, mas em concentrações elevadas, produzem modificações adversas aos componentes celulares e podem causar um desequilíbrio oxidante / antioxidante (Valko et al., 2006). Este desequilíbrio em favor dos oxidantes contribui para muitas condições patológicas,

incluindo câncer, distúrbios neurológicos, (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000) aterosclerose, hipertensão, isquemia, diabetes, fibrose pulmonar idiopática e doença pulmonar obstrutiva crônica (FITZPATRICK et al., 2009; KASPAROVÁ et al., 2005).

O organismo também tem uma variedade de antioxidantes que servem para contrabalançar o efeito de agentes oxidantes. Estes podem ser divididos em duas categorias: enzimáticos que incluem a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, a glutathione transferase, etc, e os não enzimáticos, All transretinol 2 (vitamina A), Ácido ascórbico (vitamina C) α tocoferol (vitamina E), o betacaroteno e a glutathione, que agem para neutralizar os oxidantes (BIRBEN et al., 2012). A vitamina C solúvel em água fornece uma capacidade antioxidante intracelular e extracelular, principalmente por eliminação de EROs (MANEVICH; FEINSTEIN; FISHER, 2004; MEZZETTI et al., 1996).

A vitamina E lipossolúvel é a principal defesa contra oxidantes que podem lesionar a membrana celular, desencadeia a apoptose das células cancerosas e inibe as formações de radicais livres (MASELLA et al., 2005; WHITE; SHANNON; PATTERSON, 1997).

A glutathione é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina. É o principal antioxidante hidrossolúvel e um dos principais determinantes do estresse oxidativo. Abundante em todos os compartimentos da célula, ela desintoxica o peróxido de hidrogênio e peróxidos de lipídeos, protegendo os lipídeos de ataques oxidantes (MASELLA et al., 2005).

A peroxidação lipídica induzida por EROs tem grande importância nas causas de lesão celular. Ela pode romper o arranjo da bicamada lipídica, o que pode inativar receptores de enzimas ligadas à membrana e aumentar a permeabilidade do tecido. Quando o mecanismo antioxidante é exaurido, as membranas celulares ficam irreversivelmente danificadas (NIKI et al., 2005). O estresse oxidativo também pode danificar a estrutura e função de proteínas

celulares envolvidas em vias de regulação de transdução de sinais e expressão gênica (BARFORD, 2004).

Os organismos aeróbios que integraram os sistemas antioxidantes, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimática, são geralmente eficazes em bloquear os efeitos nocivos de EROs. Quando ocorre o estresse oxidativo, as células tentam contrariar os efeitos oxidantes e restaurar o equilíbrio redox pela ativação ou silenciamento de genes que codificam enzimas de defesa, os fatores de transcrição e as proteínas estruturais (BIRBEN et al., 2012).

Esses achados indicam que o desequilíbrio entre a produção de substâncias pró-oxidantes e a defesa antioxidante pode ter repercussões na função renal. O estresse oxidativo renal aumentado em paralelo com alterações de função renal ocorre mesmo anteriormente ao surgimento da hipertensão (MAGALHÃES et al., 2006a; VIEIRA-FILHO et al., 2009). Uma das formas do estresse oxidativo renal aumentar os níveis pressóricos consiste na redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, o que leva aumento da reabsorção de sódio no ramo ascendente da alça de Henle, uma outra forma consiste no aumento da resistência vascular renal (EVANS; MAJID; EPPEL, 2005).

Referências

- ANDRADE, Z. A. Schistosomal hepatopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 51–57, 2004.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática Regression of hepatic fibrosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 6, p. 514–520, 2005.
- ARNLÖV, J. et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 112, n. 7, p. 969–75, 16 ago. 2005.
- ABERTU SANO, H. et al. Nicotine- and tar-free cigarette smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Journal of pharmacological sciences**, v. 118, n. 2, p. 275–87, jan. 2012.
- ASCENZI, P.; FASANO, M. Serum heme-albumin: an allosteric protein. **IUBMB life**, v. 61, n. 12, p. 1118–22, dez. 2009.
- ASCENZI, P.; FASANO, M. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. **Biophysical chemistry**, v. 148, n. 1-3, p. 16–22, maio 2010.
- BAGSHAW, S. M.; GIBNEY, R. T. N. Conventional markers of kidney function. **Critical care medicine**, v. 36, n. 4 Suppl, p. S152–8, abr. 2008.
- BAKRIS, G. L. et al. Renal outcomes with different fixed-dose combination therapies in patients with hypertension at high risk for cardiovascular events (ACCOMPLISH): a prespecified secondary analysis of a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 375, n. 9721, p. 1173–1181, 2010.
- BARBOSA, C. S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl , p. 55–62, 2006.
- BARFORD, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. **Current opinion in structural biology**, v. 14, n. 6, p. 679–86, dez. 2004.
- BARROS, R. T.; KIRSTAJN, G. M.; DANTAS, M.; ALVES, M. A. R.; **Glomerulopatias: Patogenia, Clínica e Tratamento - 3ª edição**. Sarvier, 2012.
- BARSOUM, R. The changing face of schistosomal glomerulopathy. **Kidney international**, v. 66, n. 6, p. 2472–84, dez. 2004.
- BARSOUM, R. S. Schistosomal glomerulopathies. **Kidney international**, v. 44, n. 1, p. 1–12, jul. 1993.

BARSOUM, R. S. Tropical parasitic nephropathies. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 14 Suppl 3, p. 79–91, jan. 1999.

BASSILY, S. et al. Renal biopsy in Schistosoma-Salmonella associated nephrotic syndrome. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 11, p. 256–8, nov. 1976.

BERNARDI, M. et al. Albumin infusion in patients undergoing large-volume paracentesis: a meta-analysis of randomized trials. **Hepatology**, v. 55, n. 4, p. 1172–81, 2012.

CCI, C.; PISTOLOZZI, M.; DE SIMONE, A. Circular dichroism in drug discovery and development: an abridged review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 1, p. 155–66, set. 2010.

BINA, J. C.; PRATA, A. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211–6, 2003.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BÖKENKAMP, A. et al. Cystatin C--a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. **Pediatrics**, v. 101, n. 5, p. 875–81, maio 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ranking do saneamento**, 2011. Acessado em 2013. Disponível em:
<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/uploads/pdfs/ranking-100cidades.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: **relatório de situação: Pernambuco**. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011f.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Schistosomiasis - Biology**. Center for Disease Control and Prevention. <<http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>> Acesso em: 09 set. 2012.

COMHAIR, S. A.; THOMASSEN, M. J.; ERZURUM, S. C. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 23, n. 3, p. 350–4, set. 2000.

CORESH, J. et al. Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, n. 5, p. 920–929, maio 2002.

CORREIA, H. S. T.; DOMINGUES, A. L. C.; LOPES, E. P. A.; MORAIS, C. N. L.; SARTESCHI, C.; MOURA, I. M. F. Serum globulin levels and intensity of hepatic fibrosis in patients with mansonic schistosomiasis. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 46, n. 3, p. 194–8, 2009.

CUPPARI, K. M.; BAXMAN, A.; SAMPAIO, L. R. **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. Manole, p. 89-129, 2005.

CURHAN, G. Cystatin C: a marker of renal function or something more? **Clinical chemistry**, v. 51, n. 2, p. 293–4, fev. 2005.

CURRY, S. Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. **Vox sanguinis**, v. 83 Suppl 1, p. 315–9, ago. 2002.

CURRY, S. Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 24, n. 4, p. 342–57, jan. 2009.

DE ZEEUW, D. et al. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Circulation**, v. 110, n. 8, p. 921–7, 24 ago. 2004.

DE ZEEUW, D.; PARVING, H.-H.; HENNING, R. H. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 17, n. 8, p. 2100–5, ago. 2006.

DEINUM, J.; DERKX, F. H. Cystatin for estimation of glomerular filtration rate? **Lancet**, v. 356, n. 9242, p. 1624–5, 11 nov. 2000.

DELANEY, A. P. et al. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Critical care medicine**, v. 39, n. 2, p. 386–91, fev. 2011.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–73, jul. 2000.

DHARNIDHARKA, V. R.; KWON, C.; STEVENS, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 40, n. 2, p. 221–6, ago. 2002.

DUARTE, A. C. G. **Avaliação nutricional: aspectos clínicos e laboratoriais**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007. p. 70–343

EIJKELKAMP, W. B. A. et al. Albuminuria is a target for renoprotective therapy independent from blood pressure in patients with type 2 diabetic nephropathy: post hoc analysis from the Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist

Losartan (RENAAL) trial. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 5, p. 1540–6, maio 2007.

EVANS, R. G.; MAJID, D. S. A.; EPPEL, G. A. Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 32, n. 5-6, p. 400–9, 2005.

FILLER, G. et al. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 1–8, jan. 2005.

FINNEY, H.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. **Annals of clinical biochemistry**, v. 37 (Pt 1), p. 49–59, jan. 2000.

FITZPATRICK, A. M. et al. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 123, n. 1, p. 146–152.e8, jan. 2009.

FORMAN, J. P.; BRENNER, B. M. “Hypertension” and “microalbuminuria”: the bell tolls for thee. **Kidney international**, v. 69, n. 1, p. 22–8, jan. 2006.

FURUKAWA, M. et al. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 154, n. 2, p. 189–95, 5 set. 2011.

GAW, A. **BIOQUIMICA CLINICA: TEXTO ILUSTRADO EM CORES**. Casa da Leitura Médica, 2001.

GHUMAN, J. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of molecular biology**, v. 353, n. 1, p. 38–52, 14 out. 2005.

GRAY, D. J. et al. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 733–6, out. 2010.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–97, jun. 2012.

GUPTA, D.; LIS, C. G. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature. **Nutrition journal**, v. 9, p. 69, jan. 2010.

HATI, P. P. **Pemberian albumin pada sirosis hati. Konsensus PPHI-FKUI**. Disponível em: <<http://www.inaactamedica.org/archives/2010/20724771.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2014.

HERGET-ROSENTHAL, S.; BÖKENKAMP, A.; HOFMANN, W. How to estimate GFR-serum creatinine, serum cystatin C or equations? **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 153–161, fev. 2007.

HERRERO-MORÍN, J. D. et al. Cystatin C and beta2-microglobulin: markers of glomerular filtration in critically ill children. **Critical care (London, England)**, v. 11, n. 3, p. R59, jan. 2007.

HILLEGE, H. L. et al. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. **Journal of internal medicine**, v. 249, n. 6, p. 519–26, jun. 2001.

HILLEGE, H. L. et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. **Circulation**, v. 106, n. 14, p. 1777–82, 1 out. 2002.

HOJS, R. et al. Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, n. 7, p. 1855–62, jul. 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2012/estimativa_dou.shtm>. Acesso em: 12 maio. 2014.

IBSEN, H. et al. Does albuminuria predict cardiovascular outcomes on treatment with losartan versus atenolol in patients with diabetes, hypertension, and left ventricular hypertrophy? The LIFE study. **Diabetes care**, v. 29, n. 3, p. 595–600, mar. 2006.

ITO, S. et al. Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebro-cardiovascular risk. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 32, n. 2, p. 115–21, fev. 2009.

JOHNSON AM, BURTIS, C. A. et al. **Amino acids and proteins. In: Tietz fundamentals of clinical chemistry**. [s.l.] Saunders Elsevier, 2008. p. 286–316

KARALLIEDDE, J.; VIBERTI, G. Hypertension and microalbuminuria: risk factors for cardiovascular disease in diabetes. **Current hypertension reports**, v. 7, n. 1, p. 1–2, fev. 2005.

KASPAROVÁ, S. et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochemistry international**, v. 46, n. 8, p. 601–11, jun. 2005.

KIRSZTAJN, G. M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 257–264, ago. 2007.

- KOGA, M. et al. Correlation of glycated albumin but not hemoglobin A1c with endogenous insulin secretion in fulminant type 1 diabetes mellitus. **Journal of diabetes investigation**, v. 1, n. 6, p. 279–82, 3 dez. 2010.
- KOMATSU, T. et al. Virus trap in human serum albumin nanotube. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 10, p. 3246–8, 16 mar. 2011.
- KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 6, p. 695–704, jun. 2002.
- KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 132, n. 3, p. 171–83, 18 dez. 2008.
- LEE, J. S. Albumin for end-stage liver disease. **The Korean journal of internal medicine**, v. 27, n. 1, p. 13–9, mar. 2012.
- LEVEY, A. S. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Annals of internal medicine**, v. 130, n. 6, p. 461–70, 16 mar. 1999.
- LEVEY, A. S. et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Annals of internal medicine**, v. 139, n. 2, p. 137–47, 15 jul. 2003.
- LEVIN, A. Cystatin C, serum creatinine, and estimates of kidney function: searching for better measures of kidney function and cardiovascular risk. **Annals of internal medicine**, v. 142, n. 7, p. 586–8, 5 abr. 2005.
- LIBERATI, A. et al. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. **Internal and emergency medicine**, v. 1, n. 3, p. 243–5, jan. 2006.
- LIN, J. et al. A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 14, n. 10, p. 2573–80, out. 2003.
- MADERO, M.; SARNAK, M. J.; STEVENS, L. A. Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 15, n. 6, p. 610–6, nov. 2006.
- MAGALHÃES, J. C. G. et al. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 3, p. 611–619, 2006.
- MAIA, M. D. et al. Evaluation of splenomegaly in the hepatosplenic form of mansonic schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 101, n. 3, p. 183–186, 2007.

MANEVICH, Y.; FEINSTEIN, S. I.; FISHER, A. B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3780–5, 16 mar. 2004.

MARTINELLI, R. et al. Renal involvement in prolonged Salmonella bacteremia: the role of schistosomal glomerulopathy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 193–8, 1992.

MARTINS, T. R. et al. Cistatina C: um novo marcador para a filtração glomerular comparada ao clearance de creatinina e a creatinina sérica. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 35, n. 4, p. 207–213, 2003.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–86, out. 2005.

MENDEZ, C. M.; MCCLAIN, C. J.; MARSANO, L. S. Albumin therapy in clinical practice. **Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 314–20, jun. 2005.

MEZZETTI, A. et al. Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. Associazione Medica “Sabin”. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 44, n. 7, p. 823–7, jul. 1996.

MINCIS, M. **Gastroenterologia & Hepatologia - Diagnóstico e Tratamento**. Casa da Leitura Médica, 2008.

MOGENSEN, C. E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 310, n. 6, p. 356–60, 9 fev. 1984.

MOGENSEN, C. E.; CHRISTENSEN, C. K. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 2, p. 89–93, 12 jul. 1984.

MYERS, G. L. et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 1, p. 5–18, jan. 2006.

NAGASAWA, T. et al. Albuminuria indicates the pressure-associated injury of juxtamedullary nephrons and cerebral strain vessels in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 35, n. 10, p. 1024–31, out. 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana. 12ª Edição**. Atheneu, 2011. p. 264

NEWMAN, D. J. Cystatin C. **Annals of clinical biochemistry**, v. 39, n. Pt 2, p. 89–104, mar. 2002.

NICHOLSON, J. P.; WOLMARANS, M. R.; PARK, G. R. The role of albumin in critical illness. **British journal of anaesthesia**, v. 85, n. 4, p. 599–610, out. 2000.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 1, p. 668–76, 9 dez. 2005.

NUSSENZVEIG, I. et al. Human *Schistosoma mansoni*-associated glomerulopathy in Brazil. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 17, n. 1, p. 4–7, jan. 2002.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006 : uma revisão de literatura. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163–175, 2008.

PRATA AR, COURA JR. **Fases e formas clínicas da esquistossomose mansoni**. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz. Rio de Janeiro, p. 739, 2008.

PRATES, A. B. et al. Avaliação da Filtração Glomerular Através da Medida da Cistatina C Sérica Glomerular Filtration Evaluation Employing Serum Cystatin C Measurement. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 29, n. 1, p. 48–55, 2007.

QUINLAN, G. J. et al. Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 95, n. 4, p. 459–65, out. 1998.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 41, n. 6, p. 1211–9, jun. 2005.

RAY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª Ed. Guanabara Koogan, p. 152-182.

RICHTER, J. et al. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. SUPPL., p. 151–156, 2001.

RICHTER, J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. **Acta tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 161–83, maio 2003.

RICHTER, J. et al. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. SUPPL., p. 151–156, 2001a.

RODRIGUES, V. L. et al. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 638–642, 2010.

ROBERTS, I. et al. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 11, p. CD001208, jan. 2011.

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 423–440, 2013.

RULE, A. D. et al. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. **Annals of internal medicine**, v. 141, n. 12, p. 929–37, 21 dez. 2004.

SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; VOUDRIS, V. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 49, n. 2, p. 177–84, fev. 2011.

SHIMIZU-TOKIWA, A. et al. Serum cystatin C is a more sensitive marker of glomerular function than serum creatinine. **Nephron**, v. 92, n. 1, p. 224–6, set. 2002.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 10, n. 3, p. 324–8, maio 2007.

SOBH, M. A. et al. Effect of anti-schistosomal treatment on schistosomal-specific nephropathy. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 3, n. 6, p. 744–51, jan. 1988.

SOUZA, F. P. C. DE et al. Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history: [review]. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 1–12, jan. 2004.

THOMAS, M. C. Pathogenesis and progression of proteinuria. **Contributions to nephrology**, v. 170, p. 48–56, jan. 2011.

UHLMANN, E. J. et al. Reference intervals for plasma cystatin C in healthy volunteers and renal patients, as measured by the Dade Behring BN II System, and correlation with creatinine. **Clinical chemistry**, v. 47, n. 11, p. 2031–3, nov. 2001.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VAN DER WERF, M. J.; BORSBOOM, G. J. J. M.; DE VLAS, S. J. No effect of recall period length on prevalence of self-reported haematuria in *Schistosoma haematobium*-endemic areas. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 373–4, 2003.

VEZOZZO, D. C. P. et al. Assessment of portal hemodynamics by Doppler ultrasound and of liver morphology in the hepatosplenic and hepatointestinal forms of schistosomiasis mansoni. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 8, p. 1413–1419, 2006.

VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 36, n. 12, p. 1157–63, dez. 2009.

VILHELMSDOTTER ALLANDER, S. et al. Regional variation in use of exogenous and endogenous glomerular filtration rate (GFR) markers in Sweden. **Uppsala journal of medical sciences**, v. 117, n. 3, p. 273–8, ago. 2012.

VISVARDIS, G. et al. Glomerular filtration rate estimation in renal transplant patients based on serum cystatin-C levels: comparison with other markers of glomerular filtration rate. **Transplantation proceedings**, v. 36, n. 6, p. 1757–9, 2004.

WACHTELL, K. et al. **Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study.** *Annals of Internal Medicine*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644892>>.

WEIR, M. R. Microalbuminuria and cardiovascular disease. **Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN**, v. 2, n. 3, p. 581–590, 2007.

WHITE, E.; SHANNON, J. S.; PATTERSON, R. E. Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 6, n. 10, p. 769–74, out. 1997.

WONG, F. Drug insight: the role of albumin in the management of chronic liver disease. **Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology**, v. 4, n. 1, p. 43–51, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health status indicators**. WHO Library Cataloguing. in: Publication Data. 2008. Acessado em 2013. Disponível em: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2011_Full.pdf

YANG, F. et al. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. **Journal of structural biology**, v. 157, n. 2, p. 348–55, fev. 2007.

YUSUF, S. et al. Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 372, n. 9644, p. 1174–83, 27 set. 2008.

YUYUN, M. F. et al. Absolute level and rate of change of albuminuria over 1 year independently predict mortality and cardiovascular events in patients with diabetic nephropathy. **Diabetic medicine a journal of the British Diabetic Association**, v. 20, n. 4, p. 277–282, 2003.

YUYUN, M. F. et al. Microalbuminuria and stroke in a British population: the European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) population study. **Journal of internal medicine**, v. 255, n. 2, p. 247–56, fev. 2004.

Capítulo II – Artigo submetido a Revista Acta Trópica

Microalbuminuria in patients infected with schistosomiasis in Pernambuco-Brazil

Microalbuminuria in patients infected with schistosomiasis in Pernambuco-Brazil

Compagnon, M.C ¹; Domingues A.L.C ²; Pimentel, M.C.B ¹; Albuquerque, M.C.P.A ¹; Silva, R.A ¹; Lima Filho, J.L ^{1*}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 - Recife, Pernambuco - Brazil.

² Departamento de Medicina Clínica - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901- Recife, Pernambuco - Brazil.

*Author for correspondence: Milton Cezar Compagnon,
miltoncompagnon@hotmail.com Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

ABSTRACT

Schistosomiasis is chronic and debilitating disease that affects approximately 240 million people worldwide and another 700 million living in endemic areas of developing countries, which has been a public health problem in Brazil (6,780,683 cases in 2009). The chronic schistosomiasis can lead to inflammatory processes and kidney damage due to high endothelial oxidative stress that can cause microalbuminuria, which has been associated to later development of cardiovascular diseases. Then, would the microalbuminuria be a new alternative non-invasive marker for patients with hepatosplenic schistosomiasis (HEH) infected with the parasite *Schistosoma mansoni* (SM)? For answering this question, albumin concentration indexed to urinary creatinine, was investigated in 130 patients that showed hepatosplenic fibrosis due to SM infection (SM group) compared to 40 control patients (C group). Inclusion criteria required nonhypertensive, nondiabetic and nonsplenectomized patients. From the 130 evaluated patients, 14.6% (11 men and 8 women) presented microalbuminuria (values between 30 and 300 mg/g creatinine) compared to C group that showed 5.0 % (1 man and 1 woman). Of the total 19 patients with microalbuminuria, 79.0% of them (8 men and 7 women) had esquistossomose hepatosplenic HEH, and only 21.0% (3 men and 1 woman) had schistosomiasis hepatointestinal (HIE). The renal glomerular filtration (RGF) and arterial pressure (AP) increased in SM group compared to C group. The results of these studies suggest that microalbuminuria can be used as a new marker non-invasive for previous diagnostic of the schistosomal glomerulopathy.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, microalbuminuria, hepatosplenic schistosomiasis, hepatointestinal schistosomiasis, renal glomerular filtration, arterial pressure.

1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease that affects approximately 240 million people worldwide and another 700 million living in endemic areas of developing countries. In sub-Saharan Africa are recorded 200 thousand deaths annually due to parasitosis. In Brazil, the population infected with *Schistosoma mansoni* reached 6,780,683 people in 2009 (World Health Organization, 2011). Untreated schistosomiasis can develop into a chronic phase, reducing the ability of the infected person for the job, and other complications that offer health risk such as renal diseases. The nephrotic syndrome is the most frequent form of clinical symptom of schistosomal nephropathy. Renal involvement in schistosomiasis is an important cause of end-stage renal disease and increases the socioeconomic impact of schistosomiasis (Lambertucci et al., 1988; Lambertucci, 1993).

The incidence of renal diseases in the Brazilian population that displays hepatosplenic schistosomiasis is approximately 12 to 15% (Lambertucci et al., 1988; Rodrigues et al., 2010). Although the most common forms of renal involvement induced by *Schistosoma mansoni* are mesangium and membrano-proliferative glomerulonephritis, there is still indicative of pathological type of glomerulopathy developed by Brazilian patients (Nussenzveig, 2002). In addition, there are no studies in the literature about the potential risk for these patients develop cardiovascular diseases.

(Mogensen and Christensen, 1984) reported for the first time that microalbuminuria predisposes the eventual appearance of clinical proteinuria and early mortality in type II diabetes. The mechanism that causes increased urinary albumin excretion is not well defined and the reasons why this excretion is associated with increased cardiovascular risk has not yet

been established. The prevailing explanation is that microalbuminuria is considered as generalized disorder of the vascular endothelium with increase of its permeability, allowing the releasing of albumin through the glomerular membrane (Yuyun et al., 2005).

Microalbuminuria, 30-300 mg/g creatinine of albumin, has a high prevalence in patients with arterial hypertension and diabetes, but may occur between 5 and 7% of young health people (de Zeeuw et al., 2006) and has been associated with the later development of cardiovascular diseases (Yuyun et al., 2003). One of the characteristic findings in these patients was high oxidative stress of the vascular endothelium (Yuyun et al., 2005). Thus, microalbuminuria is not only a marker of kidney disease, but also it has been identified as a predictor of cardiovascular disease and arterial hypertension (Karalliedde and Viberti, 2004; de Zeeuw et al., 2006; Weir, 2007). Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity (Hillege et al., 2001).

The mechanisms involved in renal disease because of changes in sodium homeostasis in hemodynamic aspects occur such as increase intraglomerular hydrostatic pressure (Takenaka et al., 1992) and non-hemodynamic terms lead to the development of inflammatory processes and oxidative stress (Magalhães et al., 2006).

The immune response has been associated with increased oxidative stress and endothelial dysfunction that can lead to microalbuminuria, which has been associated with the subsequent development of cardiovascular diseases. Based on the literature above cited, it was investigated in the present work the occurrence of microalbuminuria as a new non-invasive marker for patients carriers of the hepatosplenic (HEH) or hepatointestinal (HEI) schistosomiasis with periportal fibrosis, and the correlation with renal glomerular filtration (RGF) and levels of arterial pressure (AP).

2. Experimental Design

2.1. Selection of patient groups

130 patients diagnosed with schistosomiasis (SM) in the Outpatient Clinics of Schistosomiasis Hospital - Federal University of Pernambuco – UFPE were included in the present study. They were treated at the Hospital das Clinicas – UFPE, presenting the form hepatosplenic schistosomiasis, periportal fibrosis associated with any degree, 61.5% (47 men and 33 women) or hepato-intestinal form with periportal fibrosis from degree D, 38.5% (24 men and 26 women). The results were compared to those obtained from 40 health people control (C group), coming from the same social class. The criteria for inclusion in the study were age between 18 and 60 years, have not performed splenectomy and not being a carrier of hypertension, diabetes or any disease that compromises renal function. Patients with history of prior antihypertensive treatment also were considered hypertensive. It was evaluated in each person pressure level and urinary excretion of albumin and creatinine. Initially, the patients were instructed about the study objectives (Term of Consent approved by the Ethics and Human Research Center of Health Sciences (CCS - FUPE), 0355.0.172.000-08).

2.2. Ultrasound of the Abdomen

All patients underwent ultrasonography of the upper abdomen, with Siemens Acuson X150 apparatus using a 3.5 MHz convex transducer and according to the Niamey protocol (WHO, 1996) for classification of periportal fibrosis and confirm the diagnosis and clinical form of Schistosomiasis.

2.2. Evaluation of arterial pressure (AP)

For arterial pressure measurement was used a sphygmomanometer mercury column – plus (Unitec ® RD121) and a stethoscope (Litmann ® Cardiology III). Three measurements were performed during each medical visit which analysis was done based on the Classification of SAP according to the recommendations of the VI Brazilian Guidelines on Hypertension, 2010. The selected patients were submitted to following procedures: 1- Measuring the circumference of the arm; 2- Selection of the proper cuff to the arm; 3- Placing the cuff without leaving gaps above the cubital fossa, about 2 to 3 cm; 4- Centering the middle of the compression cuff over the brachial artery; 5- Estimating the level of systolic pressure (palpating the radial pulse and inflate the cuff until his disappearance quickly deflate and wait 1 minute before measuring); 6- Palpate the brachial artery in the cubital fossa and put the stethoscope; 7- Inflating rapidly to exceed 20 to 30 mmHg the estimated level of systolic pressure; 8- Proceeding the deflation slowly (rate of 2 to 4 mmHg per second); 9- Determining systolic pressure (SP) at auscultation of the first sound which should be faint sound followed by regular beats, and, after, slightly increase the rate of deflation; 10- Determining the diastolic pressure in the disappearance of sound; 11- Listening about 20 to 30 mmHg below the last sound to confirm his disappearance and then proceeding to complete and rapid deflation; 12- If the beats persist until the zero level, determining the diastolic pressure (DP) in the muffling of sounds and noting the values of systolic/diastolic/zero; 13- Waiting 1-2 minutes before new measurements; 14- Informing the AP values obtained for the patient.

The classification of AP according to the measure in casual office (> 18 years): great SP (mmHg) <120 and DP (mmHg) < 80; normal SP (mmHg) <130 and DP (mmHg) < 85; neighboring SP (mmHg) 130-139 and DP (mmHg) 85-89; stage 1 hypertension SP (mmHg)

140-159 and DP (mmHg) 90-99; stage 2 hypertension SP (mmHg) 160-179 and DP (mmHg) 100-109. (VI Brazilian Guidelines on Hypertension, 2010).

HERE TABLE 1

2.3. Analysis of urinary albumin and creatinine

Microalbuminuria was measured and confirmed on 3 samples (P0, P1 and P2) with an interval of 6 months based on The American Diabetes Association (2002) which recommends that the albumin should always be confirmed in at least two of three samples, with an interval of 3 to 6 months.

Urine samples were collected in universal collection bottle delivered to patients at the defined time intervals. The samples were stored in a freezer at -80 °C for a period of 6 months. For analysis, the samples were previously centrifuged at 15,000 rpm for 10 min, followed by the quantitative determination of albumin and creatinine. The reading was performed mixing albumin with Antiserum N reagent (Siemens, Germany), a liquid animal serum obtained from the rabbits with highly purified human albumin, measured by the technique of immunonephelometry (Nephelometer BN II, Dade Behring, Germany).

The creatinine amount was measured by equipment for biochemistry (Dimension RXL Max, Dade Behring, USA) using as reagent kit of creatinine (CREA Flex ® reagent cartridge, Siemens, USA). The results were expressed as mean SD.

2.4. Renal glomerular filtration (RGF)

The renal function was dimensioned using the MDRD equation (Modification of Diet in Renal Disease) as described by Levey (2003).

$$\text{MDRD} = 186 \times (\text{serum creatinine})^{-1.154} \times (\text{age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.21 \text{ if African-American})$$

2.5. Statistical analysis

Descriptive statistics were performed using Prism 4 software for Windows to obtaining values as mean $\pm$ SD. The comparison of data was performed by Student T test, with significance level of $p < 0.05$.

3. Results

To determine whether there was any relation between increased arterial pressure, microalbuminuria and changes in renal glomerular filtration, it was performed measurements in the same periods P0, P1 and P2 at defined intervals of six months. Table 2 shows the clinical characteristics of the 130 patients (SM group) and 40 health people used as C group. In spite of the clinical characteristics, only significant difference in mean agis between the men of the SM group and their respective control, as shown in Table 2, but did not interfere in the results because it is in the age range from 18 up to 60 years.

TABLE 2 HERE

3.1 Urinary albumin / creatinine relation

Regard the 130 patients studied, 14.61% (11 men and 8 women) had microalbuminuria (values between 30 and 300 mg/g creatinine) obtained from three laboratorial evaluations. However, in the first assessment, only 7.7% of the SM group (7 men and 3 women) showed microalbuminuria while 92.3% (61 men and 54 women) had normal levels. In the second evaluation, 11.5% (10 men and 5 women) of the SH group showed microalbuminuria and 88.5% had normal values. At the end of the third evaluation, it was considered patients with

microalbuminuria those whose value remained between 30 and 300 mg/g creatinine in at least two evaluations. During this period, 111 from 130 patients studied, had values within the normal range, i.e. levels < 30 mg/g creatinine of albumin in urine.

In control group, only 5.0% (1 men and 1 women) showed microalbuminuria in the three measurements. Fig. 1 presents the evolution of microalbuminuria in a period of 12 months being considered the relationship of the levels of urinary albumin and creatinine in It was observed that the total of 19 patients with microalbuminuria, 79.0% of them (8 men and 7 women) had esquistossomose hepatosplenic HEH, and only 21.0% (3 men and 1 woman) had schistosomiasis hepatointestinal (HIE). In comparative study of the test group, microalbuminuria level was different and statistically significant in men from SM group compared to the respective control (Fig. 1A). In the women there was also significant difference compared to control and in the own group relation to P0 and P2 samples (Fig. 1B).

FIGURE 1 HERE

3.2 Renal glomerular filtration (RGF)

The results of renal glomerular filtration (Fig. 2), calculated by MDRD equation, showed that P1 were similar in both groups while in P0 and P2 samples were different and statistically significant as in the SM group men (6.42% lower than the C group) as SM group women (5.2% less than the C group). When individually analyzed, the SM group men showed P0 value (5.0%) higher than P2 and to SM group women, the P0 value was 5.5% higher than P2.

FIGURE 2 HERE

3.3 Arterial Pressure (AP) levels

The mean systolic (MSAP), diastolic (MDAP) and mean (MAP) arterial pressures were observed in the SM group (130 patients) and C group (40 health people) during the same period in which microalbuminuria was measured and calculated (6 and 12 months). In the SM group men (71 patients), the MSAP values were similar to the control group, but for SM group women (59 patients) these results were higher than respective C group in three periods tested: P0=5,92%; P1=8,01% and P3=11,1%. The MDAP results presented significant difference for P3 samples, 8.53% higher in SM group men and 9.84% SM group women compared to their respective in C group. The MAP also showed significant difference in P3 samples: 5.94% higher in SM group men and 19.38% higher in SM group women (Fig. 3).

FIGURE 3 HERE.

4. Discussion

This study was designed to investigate microalbuminuria as a new non-invasive marker for hepatosplenic (HEH) or hepatointestinal (HEI) schistosomiasis patients with periportal fibrosis, and the correlation with renal glomerular filtration (RGF) and levels of arterial pressure (AP).

The results found demonstrate that the albumin excretion (Fig. 1), renal glomerular filtration (Fig. 2) and arterial pressure levels (Fig. 3) were increased compared to their respective controls. The patients that showed microalbuminuria had their pressure levels significantly increased which suggests that they are under the risk of later cardiovascular events. However, it was observed that the patients with albumin level below 30 mg/g creatinine (sub-estimated in clinical practice) also had increase of their AP (data not shown).

Our results are similar to studies reported by (Arnlöv et al., 2005) about non-hypertensive and non-diabetic patients. The Framingham Heart Study concluded that low-grade urinary albumin excretion was associated with increase of cardiovascular disease (CVD) risk and mortality in non-hypertensive and non-diabetic patients. In the same study, the increase of CVD risk was evident at levels well below the current diagnostic threshold for microalbuminuria, although cardiovascular mortality risks were elevated in patients with low-grade albuminuria, the increases were modest in terms of the absolute event rates.

The urinary albumin excretion increased is a condition that can lead to hypertension (Forman et al., 2008) and chronic renal failure (Ruggenti et al., 1998). Some studies have demonstrated that increasing levels of urinary albumin excretion, even within the normal range (< 30 mg/g creatinine), is associated with crescent risk of cardiovascular events for non-diabetic patients, but it has been very high for individuals that have multiple cardiovascular risk factors, such as those with left ventricular hypertrophy (Wachtell et al., 2003; Gerstein et al., 2001). Microalbuminuria is a predictor of future diabetic nephropathy (Kumar et al., 2009).

The increased glomerular filtration that occurs in persons with early changes in renal function is associated to albumin excretion between 30 and 300 mg/g creatinine during 24 h (de Zeeuw et al., 2006). Generally, individuals with glomerulonephritis associated with schistosomiasis are young adults (more often male) from endemic areas that have hepatomegaly by physical examination and in the most cases, splenomegaly (Andrade and Van Marck, 1984). Although, majority of patients are carriers of the hepatosplenic form of schistosomiasis, renal involvement has also been observed in patients with the disease hepatointestinal (Abensur et al., 1992; Sobh et al., 1988). In this way, clinical studies have, in

this way found no correlation between the clinical forms of schistosomiasis and the degree of renal involvement (Sobh et al., 1989).

The clinical features presented by individuals who participated in this study were similar to those presented by patients with at the early stages of schistosomal nephropathy or nephrotic syndrome. At this stage, the patient is usually asymptomatic and with varying degrees of renal impairment. Renal involvement can be determined by microscopic hematuria and proteinuria, but hepatosplenomegaly, arterial hypertension and portal hypertension are already presents (Nussenzveig, 2002).

The glomerulopathies associated with schistosomiasis exhibit a broad spectrum of clinical manifestations that extend from an asymptomatic microalbuminuria to end-stage renal disease. This range has led to a clinicopathologic classification known as "AFRAN," for the African Association of Nephrology, which endorsed it in 1992. The results of this work can be included in the Classes III and IV that comprise the schistosomiasis cases that exhibit proteinuria, usually within the nephrotic range, although subnephrotic proteinuria occurs in 10% to 20% of patients or in the most of patients with progressive disease (Barsoum, 1993; Barsoum et al., 1996).

Also the results showed an increase of mean arterial pressure (MAP), considering MSP and MDP, for schistosomiasis patients that presented microalbuminuria and change in the glomerular filtration. This is in agreement to microalbuminuria problem that has a high prevalence in patients with arterial hypertension and diabetes (de Zeeuw et al., 2006), which has been associated to later development of cardiovascular diseases (Mogensen et al., 1986; Yuyun et al., 2003). Reminding that one of the characteristic of these patients was high oxidative stress of the vascular endothelium (Amann et al., 2006).

Although microalbuminuria has been considered an early marker of diabetic nephropathy and associated with cardiovascular diseases, the results of this study allow us to suggest its use as a non-invasive early marker of schistosomal glomerulopathy, considering that both diabetic and schistosomal nephropathies show glomerular proteinuria by different pathophysiological mechanisms as described by (Mogensen et al., 1986; Glasscock, 1987).

5. Conclusions

All the results obtained in this work confirmed that the occurrence of microalbuminuria can be considered as a new non-invasive marker for patients carriers of the hepatosplenic (HEH) or hepatointestinal (HEI) schistosomiasis with periportal fibrosis, correlated with renal glomerular filtration (RGF) and levels of arterial pressure (AP).

Acknowledgments

The authors thank the financial support of, LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) and Leucio Duarte Vieira Filho (Depto de Fisiologia e Farmacologia Renal) UFPE.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Abensur, H., Nussenzveig, I., Saldanha, L. B., Pestalozzi, M. S., Barros, M. T., Marcondes, M., & Barros, R. T. (1992). Nephrotic syndrome associated with hepatointestinal

- schistosomiasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34(4), 273–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342083>
- Amann, K., Wanner, C., & Ritz, E. (2006). Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *Journal of The American Society Of Nephrology*, 17(8), 2112–2119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825329>
- Andrade, Z. A., & Van Marck, E. (1984). Schistosomal glomerular disease (a review). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4), 499–506. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02761984000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Arnlöv, J., Evans, J. C., Meigs, J. B., Wang, T. J., Fox, C. S., Levy, D., ... Vasan, R. S. (2005). Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 112(7), 969–75. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.538132
- Barsoum, R., Nabil, M., Saady, G., Genin, C., Saleh, E., Francis, M., ... el-Garem, A. (1996). Immunoglobulin-A and the pathogenesis of schistosomal glomerulopathy. *Kidney International*, 50(3), 920–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872967>
- Barsoum, R. S. (1993). Schistosomal glomerulopathies. *Kidney International*, 44(1), 1–12. doi:10.1038/ki.1993.205
- De Zeeuw, D., Parving, H.-H., & Henning, R. H. (2006). Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(8), 2100–5. doi:10.1681/ASN.2006050517
- Forman, J. P., Fisher, N. D. L., Schopick, E. L., & Curhan, G. C. (2008). Higher levels of albuminuria within the normal range predict incident hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(10), 1983–8. doi:10.1681/ASN.2008010038
- Gerstein, H. C., Mann, J. F., Yi, Q., Zinman, B., Dinneen, S. F., Hoogwerf, B., ... Yusuf, S. (2001). Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 286(4), 421–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466120>
- Glasscock, R. J. (1987). Clinical aspects of glomerular diseases. *American Journal of Kidney Diseases the Official Journal of the National Kidney Foundation*, 10(3), 1.
- Hillege, H. L., Janssen, W. M., Bak, A. A., Diercks, G. F., Grobbee, D. E., Crijns, H. J., ... De Jong, P. E. (2001). Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *Journal of Internal Medicine*, 249(6), 519–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11422658>

- Karalliedde, J., & Viberti, G. (2004). Microalbuminuria and cardiovascular risk. *American Journal of Hypertension*, 17(10), 986–93. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.08.010
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2009). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, (Google eBook)* (Vol. 4, p. 1464). Elsevier Health Sciences. Retrieved from http://books.google.com/books?id=_1Zmvm4JVNC&pgis=1
- Lambertucci, J. R. (1993). Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35(5), 399–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115806>
- Lambertucci, J. R., Godoy, P., Neves, J., Bambirra, E. A., & Ferreira, M. D. (1988). Glomerulonephritis in Salmonella-Schistosoma mansoni association. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(1), 97–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2963552>
- Magalhães, J. C. G., Da Silveira, A. B., Mota, D. L., & Paixão, A. D. O. (2006). Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Experimental Physiology*, 91(3), 611–619. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16513822
- Mogensen, C. E., Chachati, A., Christensen, C. K., Close, C. F., Deckert, T., Hommel, E., ... Feldt-Rasmussen, B. (1986). Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Investigation*, 9(2), 85–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3915933>
- Mogensen, C. E., & Christensen, C. K. (1984). Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *The New England Journal of Medicine*, 311(2), 89–93. doi:10.1056/NEJM198407123110204
- Nussenzweig, I. (2002). Human Schistosoma mansoni-associated glomerulopathy in Brazil. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(1), 4–7. doi:10.1093/ndt/17.1.4
- Rodrigues, V. L., Otoni, A., Voieta, I., Antunes, C. M. D. F., & Lambertucci, J. R. (2010). Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(6), 638–642.
- Ruggenenti, P., Perna, A., Mosconi, L., Pisoni, R., & Remuzzi, G. (1998). *Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. “Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia” (GISEN). Kidney International* (Vol. 53, pp. 1209–1216).
- Takenaka, T., Forster, H., De Micheli, A., & Epstein, M. (1992). Impaired myogenic responsiveness of renal microvessels in Dahl salt-sensitive rats. *Circulation Research*, 71(2), 471–480. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1628401

- Wachtell, K., Ibsen, H., Olsen, M. H., Borch-Johnsen, K., Lindholm, L. H., Mogensen, C. E., ... Aurup, P. (2003). *Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study*. *Annals of Internal Medicine* (Vol. 139, pp. 901–906). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644892>
- Weir, M. R. (2007). Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology CJASN*, 2(3), 581–590. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699466>
- Yuyun, M. F., Adler, A. I., & Wareham, N. J. (2005). What is the evidence that microalbuminuria is a predictor of cardiovascular disease events? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(3), 271–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821422>
- Yuyun, M. F., Dinneen, S. F., Edwards, O. M., Wood, E., & Wareham, N. J. (2003). Absolute level and rate of change of albuminuria over 1 year independently predict mortality and cardiovascular events in patients with diabetic nephropathy. *Diabetic Medicine a Journal of the British Diabetic Association*, 20(4), 277–282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675640>

Figure list.

Figure 1

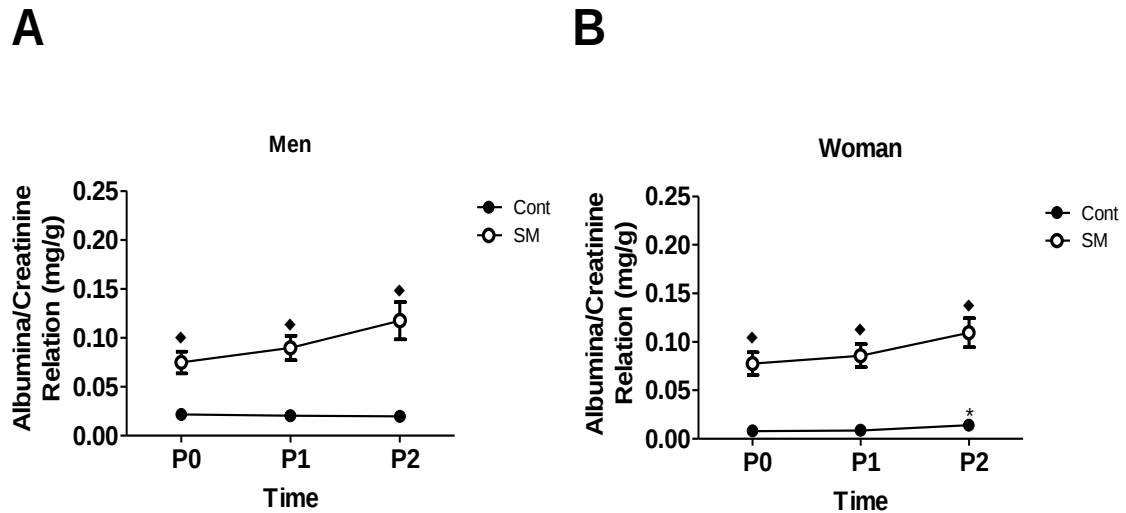


Figure 1. Relation of levels of urinary albumin and creatinine in patients infected with *Schistosoma mansoni* followed-up for 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Albumin/creatinine urinary in men (A) and women (B). Cont: healthy patients (Men: 17; Womens: 23); SM: patients infected with *Schistosoma mansoni* (Men: 71; Women: 59). Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months; and ♦P<0,05 Vs. Cont.

Figure 2

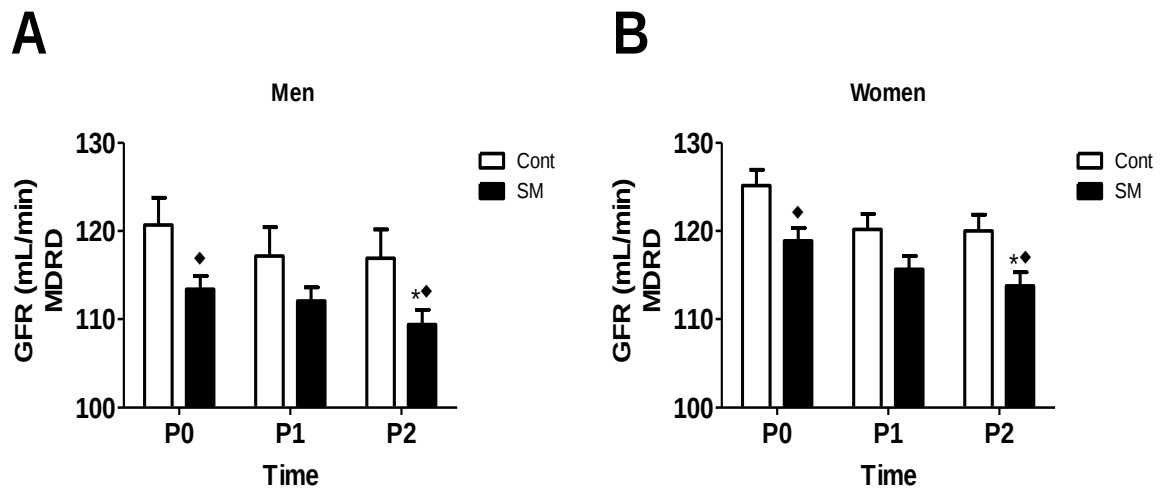


Figure 2. Glomerular filtration rate in renal pacientes infected with *Schistosoma mansoni* Followed by 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Glomerular renal filtration (GFR) in men (A) and women (B) respectively. Cont: healthy patients (Men: 17; Women: 23); SM: patients infected with *Schistosoma mansoni* (Men: 71; Women: 59 Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months and ♦P<0,05 Vs. Cont.

Figure 3

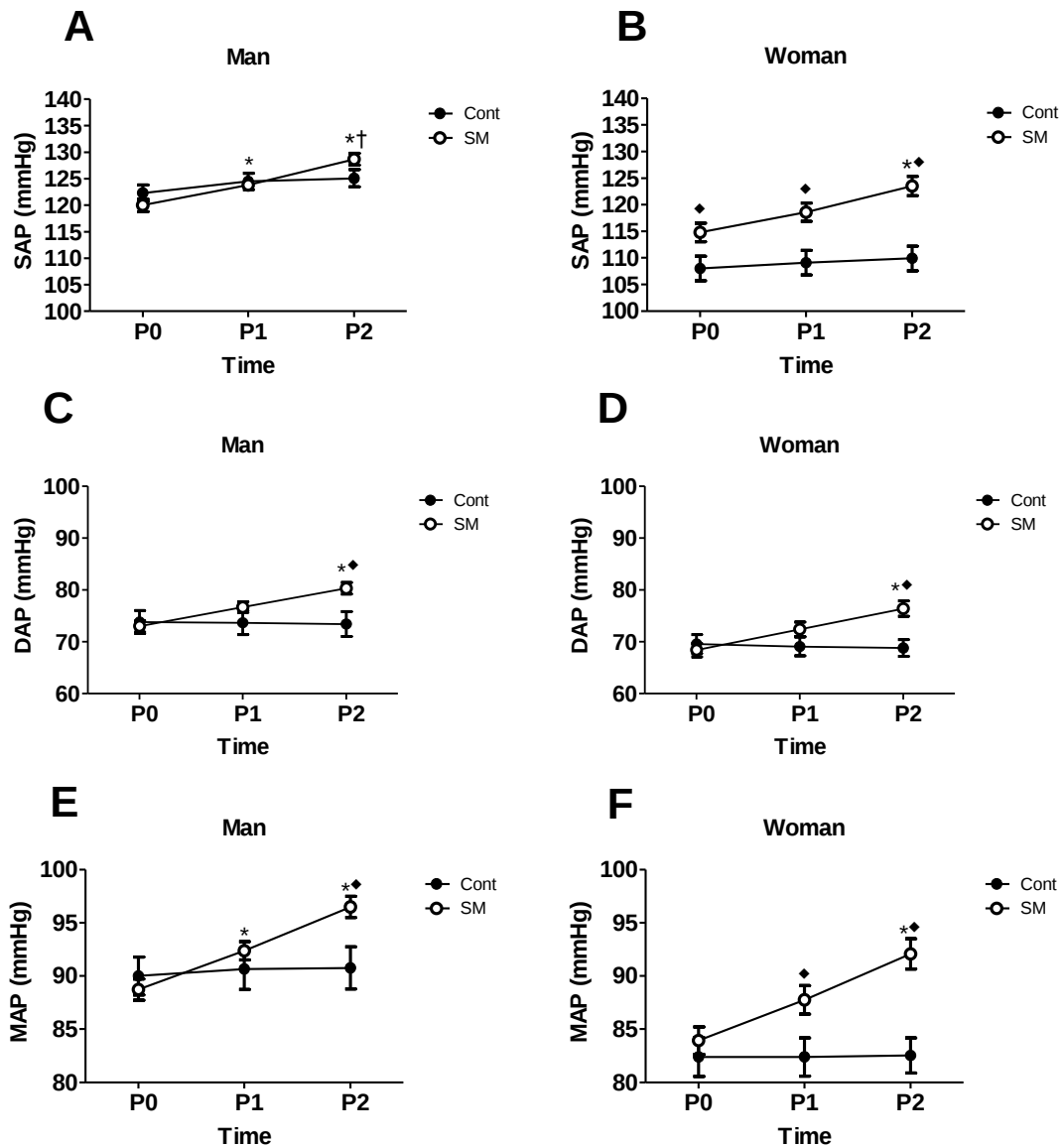


Figure 3. Arterial pressure levels in patients infected with *Schistosoma mansoni* followed for 12 months (P0= month zero; P1= 6 months; P2= 12 months). Systolic arterial pressure (SAP), diastolic (DAP) and mean (MAP) in men (A, C e E, respectively) and women (B, D e F). Cont: healthy patients (men: 17; women: 23); SM: patients infected with *Schistosoma mansoni* (Men: 71; Women: 59). Data are mean $\pm$ SEM. The differences during follow-up were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs. 6 months; †P<0,05 Vs. 12 months; and ♦P<0,05 Vs. Cont.

Table list.

Table 1. Degrees of fibrosis in individuals infected with schistosoma mansoni

Degree Fibrosis	Nº patients	%
Degree I – D	44	33,8
Degree I – E	72	55,4
Degree II – F	14	10,8
Total	130	100

Degree I-D: Fibrosis of central; Degree I-E: Advanced fibrosis; Degree II-F: Very advanced fibrosis.

Table 2. Clinical characteristics of study participants

	Entire sample	Man		Woman	
		infected	control	infected	control
participants n	170	71	17	59	23
Men / women %	100	41,8	10	34,7	13,5
Age / years	18-60	18-60	23-48	19-60	28-60
middle Ages	42,8±11,7	48,8±10,9♦	38,8±9	42±13,6	41,6±13,3
IMC	24,57±0,2913	24.80±0.4526	25.59±0.6366	23.88±0.4792	24.89±0.9657

IMC: Body mass index. The differences between experimental groups were analyzed using the Student t test. ♦P<0,05 Vs. Cont.

Capítulo III – Artigo submetido a submeter Revista Acta Trópica
Cálculo da taxa de filtração glomerular renal em pacientes portadores de
esquistossomose mansônica com os biomarcadores creatinina e cisstatina C

Calculation of kidney glomerular filtration in patients carriers of mansonic schistosomiasis with biomarkers creatinine and cystatin C

Compagnon, M.C ¹; Domingues A.L.F ²; Lima Filho, J.L ^{1*};

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 - Recife, Pernambuco - Brazil.

² Departamento de Medicina Clínica - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE , Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901- Recife, Pernambuco - Brazil.

*Author for correspondence: José Luiz de Lima Filho,
joseluiz60@mac.com Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

Summary: The measure of the glomerular filtration rate (GFR) is the laboratorial test that is most used for the evaluation of renal function of people with renal dysfunctions, as well as of healthy individuals. Currently, the most accepted and most widely used biomarker is serum creatinine, which has several limitations depending on specific characteristics of each person, including age, sex, race, corporal mass and ingestion of proteins. It can also suffer tubular secretion and can be augmented in patients with light and moderate distribution at a plasmatic level, leading to an overestimation of the glomerular filtration rate. Recently, the use of serum cystatin C has proven to be a superior biomarker to creatinine for the estimation of GFR. Its synthesis occurs in a relatively constant manner, it does not suffer influence of variables such as race and sex, it is not secreted by the renal tubules and it is not reabsorbed. Thus, levels of cystatin C in the serum reflect the quantity of glomerular filtration. With all these characteristics, can cystatin C be considered an efficient biomarker in the evaluation of the glomerular filtration rate for patients with hepatosplenic and hepatointestinal schistosomiasis? In this study, we evaluated GFR using the endogenous biomarkers serum creatinine and serum cystatin C in patients with hepatosplenic and hepatointestinal schistosomiasis with periportal fibrosis. We used as reference the equations most used in the evaluation of the glomerular filtration rate, independent from the pathological process. These equations were MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) and Cockcroft-Gault, both from the endogenous biomarker serum creatinine and the equation of Larson, used for the calculation of the GFR, using the biomarker serum cystatin C. All the results found suggest that the endogenous biomarker serum cystatin C was superior to serum creatinine in the evaluation of renal function measured by GFR in the studied patients.

Key words: renal glomerular filtration, cystatin C, creatinine.

I. Introduction

Kidney function is generally evaluated through the measurement of the glomerular filtration rate (GFR), which can show the stage of the renal disease, independent of its cause (Levey et al., 2003). Serum creatinine is the endogenous biomarker that is most widely accepted as a parameter for the evaluation of GFR (Stevens and Levey, 2005). It is the final product of cellular catabolism, with molecular weight of 13 kDa. It is secreted by the nearby tubular cells, freely filtered by the glomerulus and it is not reabsorbed. It is influenced by variables such as muscle mass, age, gender and protein ingestion. Moreover, tubular secretion of creatinine can have individual variations and also variations among people, especially those with a reduced GFR (Vigil et al., 2014; Grams et al., 2013; Koenig et al., 2005; Orlando et al., 2002).

The increase in serum creatinine concentration can lead to an overestimation of the GFR in patients with light or moderate reduction in kidney function (Stevens and Levey, 2005). Serum creatinine is also insensitive to the detection of small reductions in kidney glomerular filtration (KGF), due to the non-linear relation between the concentration in the plasma and the real glomerular filtration (National Kidney Foundation, 2002; Filler et al., 2005). Some authors consider its endogenous clearance little sensitive, as it does not enable the detection of reductions in GFR lower than 50%, nor fast alterations in the kidney function (Orlando et al., 2002). However, there are advantages in its use when evaluating GFR, as it is relatively easy to handle and of low cost (Newman, 2002).

The serum creatinine measurement must be very precise and with minimum probability of error, so that the impact on the total uncertainty of the estimated GFR remains within clinically acceptable levels. The serum creatinine concentration corresponds to a GFR above 60 mL/min/1.73 m² (National Kidney Foundation, 2002).

The GFR in young adults is approximately 125 (± 20) mL/min/1.73 m² (National Kidney Foundation, 2002) and diminishes after age 40 at 10 mL/min/1.73 m² per decade, or 1 mL/year (table 1). In this regard, GFR values between 60-90 mL/min/1.73m² can be considered normal. This reduction in kidney function is physiological in healthy people, but it can be more pronounced in individuals with specific pathologies such as hypertension, for instance. Values lower than 60 mL/min/1.73 m² are considered as reduced kidney function (Manjunath et al., 2001).

TABLE 1 HERE

It is a consensus of the National Kidney Foundation (NKF) 2002, to indicate that the isolated measurement of creatinine is not necessarily the best way to evaluate kidney function. Instead or complementarily, the use of equations that consider serum creatinine and other variables, such as race, age, gender, and body muscle index (BMI) are recommended. The more variables used the higher the chances for a more precise result.

Kidney function can be measured by using equations that estimate the GFR. One of these equations is that of Cockcroft-Gault, described for the first time in 1976, which is based on the creatinine clearance (CrC) to estimate the GFR (Cockcroft and Gault, 1976). It can be used with or without the correction by corporal surface, generally estimated as 1.73m² (National Kidney Foundation, 2002). It can be described without the correction by corporal surface:

$$\text{CrC in mL/min} = \frac{(140 - \text{age (years)}) \times \text{weight (Kg)} \times 0.85 \text{ (if a woman)}}{(72 \times \text{serum creatinine})}$$

Or with the correction by corporal surface:

$$\text{CrC in mL/min} = \frac{(140 - \text{age (years)}) \times \text{weight (Kg)} \times 1.73\text{m}^2 \times 0.85 \text{ (if a woman)}}{(72 \times \text{serum creatinine})}$$

The equation Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (Levey et al., 1999), is also very much used to evaluate kidney function. At first, it was developed for individuals with chronic kidney disease, not including healthy people. Later, it was modified and it started to also be used for healthy people (Levey et al., 2003). The conclusion is that the MDRD equation is more precise than the Cockcroft-Gault equation for people with GFR lower than 90 mL/min/1.73m² (Finney et al., 1997), however, both equations come from the GFR measurement in adults. In this study, the equation MDRD was used with four variables to calculate the GFR of patients with hepatosplenic or hepatointestinal schistosomiasis.

GFR (mL/min/1.73 m²) = 186 x (serum creatinine)^{-1.154} x (age)^{-0.203} x (0.742 if a woman), or depending on race, in cases where the patient was black the equation used was:

GFR (mL/min/1.73 m²) = 186 x (serum creatinine)^{-1.154} x (age)^{-0.203} x (1.21 if black) (Levey et al., 2003).

In healthy people, the MDRD equation can underestimate the GFR (Lin et al., 2003), becoming unreliable in the determination of prevalence of chronic kidney disease (Rule et al., 2004). However, the limitations of the MDRD equation provoked the proposal of a new calculation to estimate GFR, using iohexol, dependent of cystatin C for people whose values of serum creatinine are in a range of normality, but with kidney function varying from normal to moderately reduced (Levey et al., 2003). Later, cystatin C started to be studied as a biomarker to estimate GFR, becoming a possible future substitute of serum creatinine in the evaluation of GFR estimates (Larsson et al., 2004).

The equation of Larson is described in the following manner:

GFR= 77.24*Cystatin C [mg/L]^{-1.2623}, (Rule et al., 2004).

Cystatin C is a basic non-glycosylated protein of 120 amino acids and a molecular weight of 13 kDa, belonging to family two of the cystatins. It is produced at a constant rate by all nuclear cells (Newman, 2002; Christensson et al., 2003; Myers et al., 2006). Its synthesis

rate does not seem to be altered by the coexistence of inflammatory processes and it is reasonably consistent. Its plasma level seems not to suffer variations because of extra renal reasons, which characterizes it as an adequate marker of the glomerular filtration rate (Filler et al., 2005; Myers et al., 2006). It is filtered by the glomeruli, followed by tubular reabsorption and degradation, resulting in the excretion of a small quantity of urine. It is not secreted by the kidney tubules and also it is not reabsorbed back into the serum, therefore, its serum level reflects the quantity of glomerular filtration (Levin, 2005).

Recently, a study demonstrated that cystatin C performed better than creatinine in the evaluation of kidney function in transplanted patients, and that therefore it can be a potentially more appropriate marker for estimating the GFR and detecting functional deterioration of the kidney graft (Bagnoux et al., 2012).

Cystatin C has increasingly been more accepted in the world as an indirect marker of the glomerular filtration rate (Filler et al., 2005; Van Biesen et al., 2006). It is a good marker of kidney function and it correlates better with direct measurements of GFR, more precisely of creatinine, since its serum concentration is independent from the muscle mass and does not seem to be affected by variables such as age and gender (Dharnidharka et al., 2002; Macisaac et al., 2011). Moreover, it is fairly stable in serum or plasma samples. Stability at room temperature is of 7 days; at -20°C, from 1 to 2 months; and at -80 °C, 6 months. It can be maintained without separation of total blood for up to 24 hours without significant loss in its concentration. Additionally, it resists various cycles of freezing/thawing (Myers et al., 2006; Prates et al., 2007).

Currently, two immunological methods are used to measure serum Cystatin C, the PETIA (particle-enhanced turbidimetric immunoassay) and PENIA (particle-enhanced

ephelometric immunoassay) – both are simple, accurate, fast and require few serum samples (Martins et al., 2003; Filler et al., 2005; Prates et al., 2007)

In this study, we used the PENIA method, in which the reference values have an interval between 0.53 mg/L and 1.2 mg/L (Finney et al., 2000; Uhlmann et al., 2001).

There are many studies which discuss the GFR, whether in relation to the biomarkers used (Myers et al., 2006; Van Biesen et al., 2006; Astor et al., 2009; Reese and Feldman, 2009; Bargnoux et al., 2012; Malheiro et al., 2012) or in pathological states which favor the decline of kidney function (Séronie-Vivien et al., 2008; Villeval'de et al., 2010; Peralta et al., 2011; Martínez-Martínez and Abud-Mendoza, 2012). With regards to the patients with mansonic schistosomiasis there are a number of publications referencing glomerulopathologies associated to schistosomiasis (Nussenzveig, 2002; Barsoum, 2004; Lambertucci et al., 2007; Rodrigues et al., 2010) but the approach respecting the GFR in these patients is scarce in the literature.

In this context, the objective of this study was to evaluate the glomerular filtration rate (GFR) in patients with mansonic schistosomiasis in the hepatosplenic and hepatointestinal forms, with periportal fibrosis from degree I-D, using the endogenous biomarkers serum cystatin C and serum creatinine. The equations used in the calculation of the GFR are the MDRD, Cockcroft-Gault and Larson.

2. Material and methods

The population studied was of patients with mansonic schistosomiasis with periportal fibrosis, composed of a total of 162 persons. The sample calculation was carried out based on 50% (81 patients) of the patients, plus 30% (49) of the total of the sample, taking into consideration the percentual of losses. The sample was constituted by 130 patients diagnosed

with mansonic schistosomiasis (MS) in the hepatosplenic and hepatointestinal forms, associated with periportal fibrosis from degree D. All were attended in the schistosomiasis outpatient clinic of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco – UFPE. The results were compared with 40 healthy persons of the control group (group C), from the same social class. The serum creatinine and serum cystatin C were measured and evaluated. Age, height and weight were also registered to enable the GFR evaluation from these biomarkers.

2.1 Inclusion criteria

The inclusion criteria in this study were: age between 18 and 60 years, not having carried out a splenectomy and not having arterial hypertension, diabetes or any other disease which compromises kidney function. Patients with a history of previous anti-hypertensive treatment were also considered hypertensive. In the beginning of the study, the patients were informed about the objectives of the study (Consent statement approved by the Committee of Ethics and Research with Human Beings of the Center of Health Sciences (CCS - UFPE), 0355.0.172.000-08).

2.2. Abdomen ultrasound

All patients carried out an ultrasound of the upper abdomen, with the device Siemens Acuson X150, using convex transducer of 3.5 mHz, according to the protocol of Niamey (WHO, 1996), to classify the periportal fibrosis and confirm the diagnosis and clinical form of the mansonic schistosomiasis.

2.3 Evaluation of the height, weight, race and age

During the clinical interview at the doctor's office, the patient was weighed using a mechanical anthropometric scale (Welmy, modelo 104-A), which was also used to measure his/her height. During the procedure, we solicited the removal of accessories from the body. The patient remained in the standing position and barefoot on the scale. To determine race the study merely considered black or white since they were the only ones present in the study. Age was confirmed through the registration of official identity documents (RG).

2.4 Analysis of serum creatinine

Blood samples (10 mL) were collected from patients in the laboratory, using the aseptic technique in vials, which were later centrifuged for 10 min at $1.000 \times g$, separating the serum, and then the quantitative determination of serum creatinine was carried out. The serum creatinine reading was carried out through a biochemical analyzer (Dimension RxL Max, Dade Behring, EUA) using a kit with reagent (CREA Flex® reagent cartridge, Siemens, EUA).

2.5 Analysis of serum cystatin C

Serum cystatin C was measured at the same time as the serum creatinine, using the same serum samples already processed. For the reading, a kit with reagent (N Latex Cystatin C, Dade Behring, Deerfield, IL, EUA) was used, through the immunonephelometry technique (Nephelometer BN II, Dade Behring, Germany).

2.6 Statistical analysis

The descriptive statistic was carried out using software Prism 4 of Windows. The values were registered as average $\pm$ EPM. To compare the data the student-t test was used, the values of $p < 0.05$ being considered significant.

3. Results

To determine the GFR and the possible variations according to the biomarker used, the samples of serum creatinine and serum cystatin C were processed and measured at the same time. As the interval between each collection was of six months, the measurements were carried out within this same period. The intervals were determined as P0 (first measurement), P1 (second measurement) and P2 (third measurement). Table 2 presents the clinical characteristics of the 130 patients (group MS) and 40 healthy persons used as group C. All the values are within the average used to carry out the GFR calculation.

TABLE 2 HERE

Among the patients studied, 61.5% (47 men and 33 women) had the hepatosplenic form, and 38.5% (24 men and 26 women) had the hepatointestinal form. The results of this study point to a reduction of kidney function of patients with schistosomiasis (n=130) in comparison with the 40 healthy persons (n=40) who participated in the research study. This was observed through the values obtained from the three equations (MDRD, Cockcroft-Gault and Larson) used to carry out the GFR calculation. In equation MDRD, a reduction in the GFR was observed with a statistically significant variation of 6% in the P0, and of 6.4% in the P2 in the MS group, compared with their respective controls (group C) in the male group. In the female MS group, a statistically significant difference was also observed in the reduction

of GFR in relation to the respective controls, with values of 5.1% in the P0 and of 5.2% in the P2. When using the Cockcroft-Gault equation, a reduction in the GFR was also observed with statistical difference in the male and female MS groups, in relation to their respective controls. The values found were 5.5% in P0 and 5.8% in P2 in the male MS group, and 6.3% in P0 and 8.3% in P2 in the female MS group. Finally, the Larson equation showed a GFR reduction that was statistically significant for men and women infected by the parasite *Schistosoma mansoni*, both in relation to their respective controls. The values found were of 6.7% for the P0 period and 5.7% for P2 in the male MS group and of 5.2% in P0 and 5.1% in P2 in the female MS group.

After evaluating the performance of the three formulas, it was possible to observe that the GFR values found from equations MDRD and Cockcroft-Gault were similar, with statistical differences in P0 and P2 respectively. Regarding the equation of Larson, the GFR values were also observed in P0 and P2, however, it was possible to detect a more expressive GFR reduction in the values. This data is shown in figure 1.

FIGURE 1 HERE

4. Discussion

The GFR is the best way to measure the capacity of the kidneys to depurate the blood. Moreover, expressing the level of kidney function in a continuous scale allows the development of educational programs that encourage patients and people with normal kidney function to better care for their health (National Kidney Foundation, 2002).

The serum cystatin C level is an early predictor of progression for terminal kidney disease in people with type 2 diabetes and albuminuria, as it detects small losses of kidney

function that are not detected by serum creatinine (Filler et al., 2005; Stevens and Levey, 2005). The results of this study also suggest that serum cystatin C works better than creatinine in the GFR evaluation of patients with schistosomiasis in the hepatosplenic and hepatointestinal forms (figure 1). The study showed that the GFR of these patients was reduced in a more accentuated manner when using serum cystatin C as a biomarker. When using serum creatinine as a biomarker, a smaller reduction in the GFR was observed in the same period.

Considering that the synthesis rate of serum cystatin C does not suffer alterations through the coexistence of extra-kidney inflammatory processes, it being reasonably constant (Myers et al, 2006), it is fair to suggest that the patients with hepatosplenic (HSS) and hepatointestinal (HIS) schistosomiasis did not suffer any change in the kidney filtration coefficient of serum cystatin C, which characterizes it as a biomarker that does not suffer alterations (Filler et al., 2005). Therefore, it is possible to deduce that both forms of schistosomiasis presented by the patients did not interfere in the serum cystatin C values presented by the studied patients.

Regarding the performance of formulas MDRD and Cockcroft-Gault, they had similar results, showing concordance with the serum creatinine GFR, although the values were relatively low when analyzing merely the male and female MS groups (figure 1). As the creatinine biomarker was used in both equations, this piece of data may have been overestimated by the limited performance of the MDRD equation, which suffers influence from variables such as gender, age and race; and of the Cockcroft-Gault equation, which considers gender, age and weight.

Most studied patients were Black (data not shown) and the average weight was low (table 2). These two variations (weight and race) are used in equation MDRD to evaluate

kidney function and show that the value of serum creatinine is higher in black people than it is in white people in one same GFR. The creatinine comes from muscle cells and its liberation in the extracellular medium depends on the volume and distribution of the muscle mass and is influenced by the weight (Heymsfield et al., 1983). This suggests that the GFR presented by the patients of this study may have been overestimated regarding race and mainly weight

Regardless of this, the values of the glomerular filtration rate were elevated in the performance of both equations. Another relevant piece of data is that creatinine suffers tubular secretion, from the small reductions of kidney function, increasing with the accentuated decline of kidney function (Stevens and Levey, 2005). Moreover, the endogenous clearance of serum creatinine is difficult to detect, which complicates the identification of GFR reductions of lower than 50%. This also occurs in cases of fast variations in kidney function (Finney et al., 1997; Orlando et al., 2002).

The studied patients are carriers of hepatosplenic (HSS) and hepatointestinal (HIS) schistosomiasis. This phase of the disease is characterized by degrees of fibrosis described as central fibrosis (I-D), advanced fibrosis (I-E) and very advanced fibrosis, in the classification of Niamey (Richter et al., 2001). In spite of the fact of being an extra-kidney disease, it is possible that schistosomiasis was responsible for the increase in the concentration of serum creatinine of patients, due to the inflammatory response developed during the acute phase of the infection.

From 40 years of age onward, there may be a physiological loss in kidney function of nearly 1 mL/year, National Kidney Foundation (2002). In this study, the average age of the patients varied between 18 to 60 years, representing an average of 45.4 years of age. Despite this, the results of this study did not show a significant reduction in patients' kidney function – even of those who were over 40 years of age.

In the GFR evaluation using the cystatin C biomarker, the study observed that the values were less than those of creatinine (figure 1E and 1F). This data was also shown in other studies (Filler et al., 2005; Myers et al., 2006; Bargnoux et al., 2012) which used cystatin C as a biomarker in patients with kidney dysfunction.

The results obtained in this study suggest that cystatin C offers more precise data for the evaluation of kidney function in patients with mansonic schistosomiasis. It does suffer alterations through extra-kidney inflammatory processes and it correlates better with direct measurements of GFR. Its concentration is not influenced by muscle mass, as is creatinine. It is also unaffected by variables such as age and gender (Dharnidharka et al., 2002). The patients studied had advanced hepatic fibrosis, which may have influenced the reduction of the GFR. In this advanced infectious profile of the patients, cystatin C presented a better performance than serum creatinine in the measurement of GFR.

5. Conclusion

The results of this study point to Cystatin C as a more efficient endogenous biomarker than creatinine in the GFR measurement of patients with HSS and HIS. Regarding the performance of the equations used for the screening of early kidney injury, the Larson equation was better than those of MDRD and Cockcroft–Gault.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support given by LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) and UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References:

- Astor, B.C., Levey, A.S., Stevens, L.A., Van Lente, F., Selvin, E., Coresh, J., 2009. Method of glomerular filtration rate estimation affects prediction of mortality risk. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2214–22.
- Bargnoux, A.S., Serval, A.C., Piéroni, L., Dupuy, A.M., Badiou, S., Garrigue, V., Mourad, G., Cristol, J.P., 2012. Accuracy of GFR predictive equations in renal transplantation: validation of a new turbidimetric cystatin C assay on Architect c8000. *Clin. Biochem.* 45, 151–3.
- Barsoum, R., 2004. The changing face of schistosomal glomerulopathy. *Kidney Int.* 66, 2472–84.
- Christensson, A., Ekberg, J., Grubb, A., Ekberg, H., Lindström, V., Lilja, H., 2003. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron. Physiol.* 94, p19–27.
- Cockcroft, D.W., Gault, M.H., 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16, 31–41.
- Dharnidharka, V.R., Kwon, C., Stevens, G., 2002. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* 40, 221–6.
- Filler, G., Bökenkamp, A., Hofmann, W., Le Bricon, T., Martínez-Brú, C., Grubb, A., 2005. Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research. *Clin. Biochem.* 38, 1–8.
- Finney, H., Newman, D.J., Gruber, W., Merle, P., Price, C.P., 1997. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin. Chem.* 43, 1016–22.
- Grams, M.E., Juraschek, S.P., Selvin, E., Foster, M.C., Inker, L.A., Eckfeldt, J.H., Levey, A.S., Coresh, J., 2013. Trends in the prevalence of reduced GFR in the United States: a comparison of creatinine- and cystatin C-based estimates. *Am. J. Kidney Dis.* 62, 253–60.
- Heymsfield, S.B., Arteaga, C., McManus, C.M., Smith, J., Moffitt, S., 1983. Measurement of muscle mass in humans: Validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 478–494.

- Koenig, W., Twardella, D., Brenner, H., Rothenbacher, D., 2005. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate. *Clin. Chem.* 51, 321–7.
- Lambertucci, J.R., Otoni, A., dos Reis, M.A., 2007. Nephrotic syndrome in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 492–3.
- Larsson, A., Malm, J., Grubb, A., Hansson, L.O., 2004. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 64, 25–30.
- Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., Roth, D., 1999. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* 130, 461–70.
- Levey, A.S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A.T., Levin, A., Steffes, M.W., Hogg, R.J., Perrone, R.D., Lau, J., Eknoyan, G., 2003. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* 139, 137–47.
- Levin, A., 2005. Cystatin C, serum creatinine, and estimates of kidney function: searching for better measures of kidney function and cardiovascular risk. *Ann. Intern. Med.* 142, 586–8.
- Lin, J., Knight, E.L., Hogan, M. Lou, Singh, A.K., 2003. A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2573–80.
- Macisaac, R.J., Premaratne, E., Jerums, G., 2011. Estimating glomerular filtration rate in diabetes using serum cystatin C. *Clin. Biochem. Rev.* 32, 61–7.
- Malheiro, J., Fonseca, I., Martins, L.S., Almeida, M., Pedroso, S., Dias, L., Henriques, A.C., Cabrita, A., 2012. A comparison between serum creatinine and cystatin C-based equations for estimation of graft function. *Transplant. Proc.* 44, 2352–6.
- Manjunath, G., Sarnak, M.J., Levey, A.S., 2001. Estimating the glomerular filtration rate. Dos and don'ts for assessing kidney function. *Postgrad. Med.* 110, 55–62; quiz 11.
- Martínez-Martínez, M.U., Abud-Mendoza, C., 2012. Estimating glomerular filtration rate. *N. Engl. J. Med.* 367, 1262; author reply 1263–4.
- Martins, T.R., Fadel-Picheth, C.M.T., Alcântara, V.M., Scartezini, M., Picheth, G., 2003. Cistatina C: um novo marcador para a filtração glomerular comparada ao clearance de creatinina e a creatinina sérica. *Rev. bras. anal. clin* 35, 207–213.
- Myers, G.L., Miller, W.G., Coresh, J., Fleming, J., Greenberg, N., Greene, T., Hostetter, T., Levey, A.S., Panteghini, M., Welch, M., Eckfeldt, J.H., 2006. Recommendations for

- improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin. Chem.* 52, 5–18.
- National, K. foundation, 2002. KDOQI CKD Guidelines - Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification [WWW Document]. Guidelines. URL http://www2.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p5_lab.htm
- Newman, D.J., 2002. Cystatin C. *Ann. Clin. Biochem.* 39, 89–104.
- Nussenzveig, I., 2002. Human *Schistosoma mansoni*-associated glomerulopathy in Brazil. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17, 4–7.
- Orlando, R., Mussap, M., Plebani, M., Piccoli, P., De Martin, S., Floreani, M., Padrini, R., Palatini, P., 2002. Diagnostic value of plasma cystatin C as a glomerular filtration marker in decompensated liver cirrhosis. *Clin. Chem.* 48, 850–8.
- Peralta, C.A., Katz, R., DeBoer, I., Ix, J., Sarnak, M., Kramer, H., Siscovick, D., Shea, S., Szklo, M., Shlipak, M., 2011. Racial and ethnic differences in kidney function decline among persons without chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1327–34.
- Prates, A.B., Barcellos, F., Vacaro, M.Z., Luiz, J., Camargo, J.L., Silveiro, S.P., 2007. Avaliação da Filtração Glomerular Através da Medida da Cistatina C Sérica Glomerular Filtration Evaluation Employing Serum Cystatin C Measurement. *J. Bras. Nefrol.* 29, 48–55.
- Reese, P.P., Feldman, H.I., 2009. More evidence that cystatin C predicts mortality better than creatinine. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2088–90.
- Richter, J., Domingues, A.L., Barata, C.H., Prata, A.R., Lambertucci, J.R., 2001. Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96 Suppl, 151–6.
- Rodrigues, V.L., Otoni, A., Voietta, I., Antunes, C.M. de F., Lambertucci, J.R., 2010a. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 638–42.
- Rodrigues, V.L., Otoni, A., Voietta, I., Antunes, C.M.D.F., Lambertucci, J.R., 2010b. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 638–642.
- Rule, A.D., Larson, T.S., Bergstralh, E.J., Slezak, J.M., Jacobsen, S.J., Cosio, F.G., 2004. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann. Intern. Med.* 141, 929–37.
- Séronie-Vivien, S., Delanaye, P., Piéroni, L., Mariat, C., Froissart, M., Cristol, J.-P., 2008. Cystatin C: current position and future prospects. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46, 1664–86.

- Stevens, L.A., Levey, A.S., 2005. Measurement of kidney function. *Med. Clin. North Am.* 89, 457–73.
- Van Biesen, W., Vanholder, R., Veys, N., Verbeke, F., Delanghe, J., De Bacquer, D., Lameire, N., 2006. The importance of standardization of creatinine in the implementation of guidelines and recommendations for CKD: implications for CKD management programmes. *Nephrol. Dial. Transplant* 21, 77–83.
- Vigil, A., Condés, E., Vigil, L., Gallar, P., Olié, A., Ortega, O., Rodríguez, I., Ortiz, M., Herrero, J.C., Mon, C., Cobo, G., Jiménez, J., 2014. Cystatin C as a predictor of mortality and cardiovascular events in a population with chronic kidney disease. *Int. J. Nephrol.* 2014, 127943.
- Villeval'de, S. V, Gudgalis, N.I., Kobalava, Z.D., 2010. [Cistatin C as a novel marker of renal function impairment and cardiovascular risk]. *Kardiologija* 50, 78–82.

Figure list

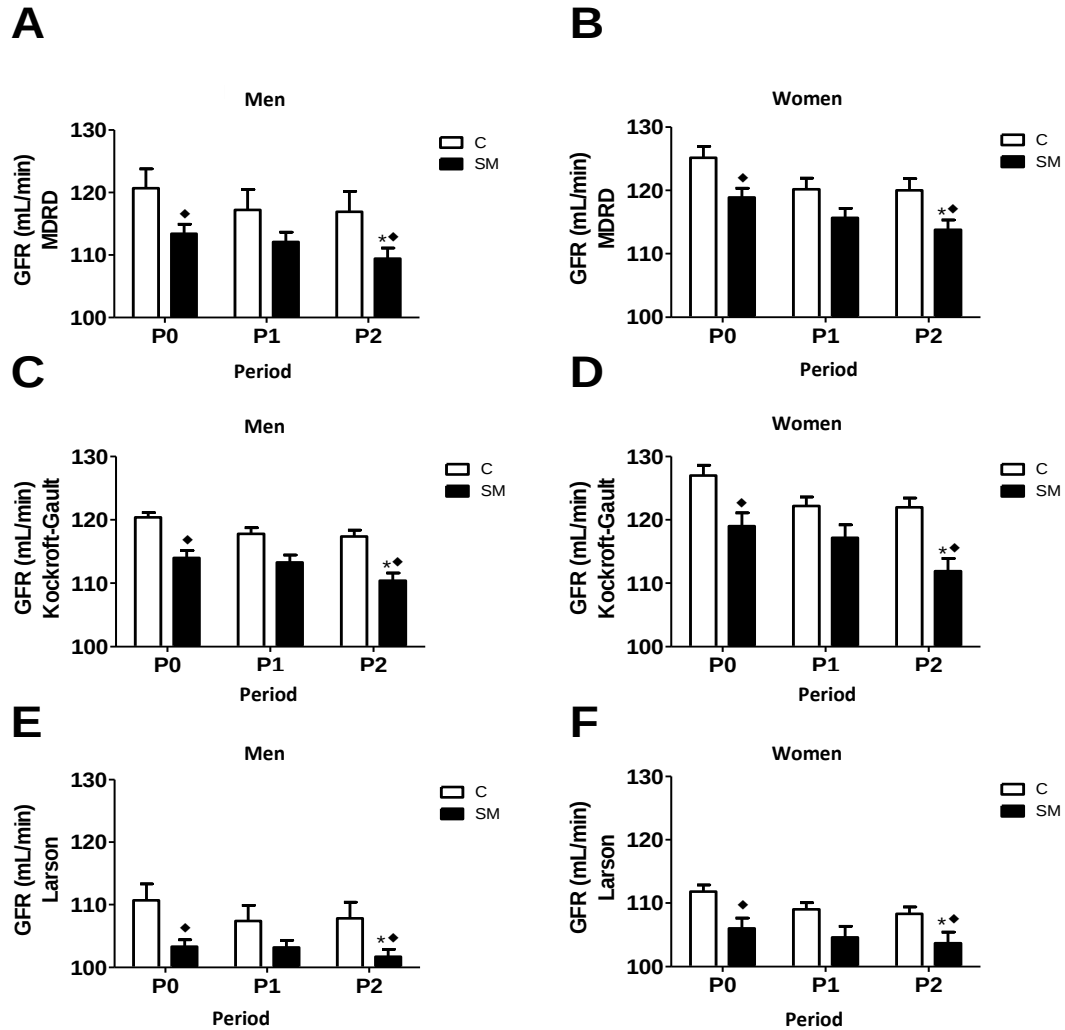


Fig 1. Glomerular filtration renal in patients infected with *Schistosoma mansoni* in period 12 months (P0= zero period, P1= period 6, P2= period 12). Men (A, C, E respectively) women (B, D e F). C: healthy patients (men: 17; women: 23); SM patients infected with *Schistosoma mansoni* (men: 71; women: 59). Results presented mean $\pm$ std. Differences were evaluated by ANOVA followed by Tukey's test. Differences between groups were analyzed using the Student t test. *P<0,05 Vs 6 period, ♦P<0,05 Vs Cont.

Table lists

Table 1. GRF reference values (National Kidney Fundation (2003))

Age (men/women)	mean GFR +/- std (mL/min/1,73m ²)
1 week	41+/-15
2-8 weeks	66 +/-25
8 weeks - 2 years	96 +/-22
2-12 age	133 +/-27
13-21 age (men)	140 +/-30
13-21 age (women)	126 +/-22

Under 12, the reference values are the same

Reference values for healthy adults are above 60 mL/min/1.73m².
Over 40 years old there is a physiological reduction 1 mL/year

Table 2. Clinical characteristics study participants

	sample	men		women	
	Total	SM	C	SM	C
Participante n	170	71	17	59	23
men / women %	100	41,8	10	34,7	13,5
midlle age	45,4	50,5	40,7	48,5	41,8
weight	57,3	66,7	40,5	58,3	63,8
height	1,61	1,64	1,65	1,56	1,60

SM – group infected with *schistosoma mansoni*. C – Control group.

Chapter IV -
Increased oxidative stress and proteinuria elevate arterial pressure in rats infected with
the *schistosoma mansoni* parasite

Increased oxidative stress and proteinuria elevate arterial pressure in rats infected with the *schistosoma mansoni* parasite

Compagnon, M.C ¹; Lima Filho, J.L ^{1*}; Domingues A.L.F ²; Albuquerque, M.C.P.A ¹

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 - Recife, Pernambuco - Brazil.

² Departamento de Medicina Clínica - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901- Recife, Pernambuco - Brazil.

*Author for correspondence: Milton Cezar Compagnon,
miltoncompagnon@hotmail.com Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

Summary

The morbidity triggered by schistosomiasis is influenced by the nature of the immunological response induced by the parasite. In this sense, the relation between the disease and the immunological response has been reported in different animal models. The systemic inflammation is associated to the generation of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall, and the immunological response has been associated to increased oxidative stress and endothelial dysfunction that can lead to proteinuria. The excess of sodium is able to induce an inflammatory response and increase the glomerular filtration, jeopardizing the oxygenation of the kidney tissue. The kidney epithelial cells react in the presence of increased hypoxia, hyperosmolarity, or intracellular dehydration with the increase of ROS production. In endothelial dysfunction, the mechanisms that participate in the reduction of the vasodilating response include the reduction of nitric oxide production and the excess of oxidant, causing various complications, among them increased arterial pressure. In this study, rats with 90 days of age were infected with the *Schistosoma mansoni* parasite and submitted to a sodium overload (saline solution at 1%), with the objective of evaluating the hepatic and kidney oxidative stress, the occurrence of proteinuria and the elevation of the levels of systolic arterial pressure. The animals of the control group did not receive sodium overload. The results showed that the infected animals had increased oxidative stress, they had proteinuria and an increase in average systolic arterial pressure. This happened more intensely in the animals that received sodium overload, independently from the infection. The excessive ingestion of water and the increased volume of urine were more evident in the animals treated with sodium overload. These results point to the conclusion that excess sodium may trigger alterations in homeostasis and induce inflammatory processes, or intensify those already existent, aside from contributing to the increase of intraglomerular hydrostatic pressure,

endothelial dysfunction, occurrence of proteinuria, increased oxidative stress and the elevation of arterial pressure.

Key Words: oxidative stress, proteinuria, arterial pressure, *Schistosoma mansoni*, endothelial dysfunction, infection.

Introduction

The impact of schistosomiasis over the hepatic function has been studied using specific approaches to determine the effect over enzymes and specific proteins derived from the liver. These studies have demonstrated that schistosomiasis alters the expression of enzymes involved in the cycle of the urea, glucose, energetic metabolism and other essential metabolic processes (Mahmoud et al., 1987; Ahmed and Gad, 1996; Harvie et al., 2007). The alterations have some similarities with other pathologies that are aggressive to the liver such as hepatocarcinoma and hepatotoxicity, however, some changes can be exclusive of schistosomiasis (Thome-Kromer et al., 2003; Fella et al., 2005).

Experimental studies suggest that in the genesis of glomerular disease, triggered by mansonic schistosomiasis, there are important factors that are inter-related, such as the genetic and racial, the severity and duration of the infestation, and the kidney collateral circulation – that result from the level of hepatic involvement, the production of antigens by the adult worm and the macrophage capacity of the liver. (Barsoum, 1993; Bina; Prata, 1985; Van Marck, 1983).

Systemic inflammation is associated to an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall (Förstermann, 2008) and to the reduction of the endothelial function. Endothelial dysfunction is characterized by a deviation of the actions of

the endothelium, which reduce vasodilatation in the prothrombotic and pro-inflammatory states. Inflammatory processes have been associated to the reduction of relaxation of the endothelium, a process that is related to an alteration in the bioavailability of nitric oxide (Kharbanda et al., 2002). Considerable evidence suggests that endothelial dysfunction and inflammation have a relation with many forms of cardiovascular and kidney diseases, including arterial hypertension and chronic kidney (Bolton et al., 2001; Monnink et al., 2002). There is experimental evidence that shows that oxidative stress influences the pathogenesis of hypertension (Kunsch and Medford, 1999).

The immunological response has been associated to increased oxidative stress and endothelial dysfunction, which can lead to proteinuria (Kunsch and Medford, 1999). The mechanisms that act in endothelial dysfunction include: the reduction of nitric oxide production and excess of oxidant production (Deanfield et al., 2005).

Many studies have reported the increase in oxidative stress related to endothelial dysfunction and the surge of pathological processes such as hypertension (Bucci et al., 2005; Kovacs et al., 2006; Förstermann, 2008). Aside from kidney disease (Monnink et al., 2002; Ascenzi and Fasano, 2010) an increase in vascular permeability occurs (Stuveling et al., 2004) and consequently there is loss of protein through the glomerular barrier (Othman et al., 2008; Salim et al., 2008). The increase in sodium ingestion is related to elevated endothelial oxidative stress (Takenaka et al., 1992; Magalhães et al., 2006). In relation to schistosomiasis, there are scarce experimental studies in the literature that correlate it with these processes.

Due to this problem, this study was elaborated with the objective of evaluating the excretion of urinary protein, the levels of systolic arterial pressure and the hepatic and kidney oxidative stress in rats infected with the *Schistosoma mansoni* parasite.

2. Material and methods

Wister rats were used in the study, all male aged 60 days, from the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami. The cercariae used in the infection of the animals were obtained from infected *Biomphalaria glabrata* mollusks, supplied by the Department of Tropical Medicine / UFPE. To evaluate the systolic arterial pressure (SAP), indirect measuring was carried out by tail plethysmography (Vida IITC Science B60-7/16", Instruments of Biological Sciences, Wills Woodland, EUA). The experimental procedure was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco (n° 23076.012872/2008-99), and carried out according to its own rules.

2.1 Animals

The animals were placed in cages and submitted to a cycle of 12 hours of light-dark, with free access to water and standard ration Labina, and were distributed randomly in experimental groups. Four groups were designated: a) control with water (C), b) *Schistosoma* with water (Sh), c) control with saline (CS), and d) *Schistosoma* with saline (ShS). In all, 32 animals distributed in four groups of eight were studied. Groups Sh and ShS were infected with the *Schistosoma mansoni* parasite at 60 days of age. From there, groups CS and ShS were submitted to a sodium overload of 0.17 M (saline 1%), substituted potable water, for 60 days. In the same period, groups C and Sh received potable water. After 150 days of age, the animals were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg, intra peritoneal) and submitted to abdominal incision to remove the liver and kidney, to evaluate the oxidative stress. The spleen was also removed to evaluate the weight, together with the liver and the kidney (data not shown).

2.2 Infection of the Animals

The animals were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg, intra peritoneal). Immediately after, an incision in the skin was carried out in the abdominal region and a metallic ring was installed, in which a volume of water of 4 mL was pipetted containing 2,000 cercariae of *Schistosoma mansoni*. The control group was submitted to the same procedure without cercariae. After 20 minutes, one sample of the material of the ring was aspirated to count the number of cercariae. The number of cercariae aspirated was less than 5% of the initial quantity in conformity with the original method. After this, the ring was removed and the suture of the incision proceeded (Cêtre et al., 1999; Moreels et al., 2004).

2.3 Evaluation of the arterial pressure

The systolic arterial pressure (SAP) was determined in mmHg, in the conscious animals at 90, 120 and 150 days of age, using the non-invasive method of tail plethysmography (Life IITC Science B60-7/16 ", Instruments of Biological Sciences, Wills Woodland, USA). Initially, the animals were contained and trained in a contention chamber for 3 days before each evaluation, at a temperature of $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for a period of 5 minutes, so that they could adapt to the experimental procedures. Five consecutive readings were obtained and the individual SAP measurement was obtained considering the average of the readings (Malkoff, 2005; Ibrahim et al., 2006; Machado et al., 2010).

2.4 Proteinuria measurement (albuminuria)

The animals were placed in individual metabolic cages and the urine was collected in bottles, attached to the bottom of each cage for 24 h – at 90, 120 and 150 days of age. The urinary proteins excretion was measured by precipitation with 3% sulfosalicylic acid (Bradley

et al. 1979). The turbidity was then determined by measuring the absorbance at a wave length of 600 nm (spectrophotometer UV-VIS RS 0223, Labomed, Culver City, CA, USA).

2.5 Evaluation of oxidative stress

The oxidative stress was evaluated through the levels of TBARS (thiobarbituric acid) according to the method of Aust & Buege (1978). Each kidney and the samples of hepatic tissue were macerated in KCl (1.15%), at a proportion of 10 mL/1g for 15 min in an ice bath and, immediately after, transferred into vials. After, 2mL of the reagents, thiobarbituric acid at 0.375% (Sigma) and trichloroacetic acid at 15% (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil), were added to each milliliter of kidney and hepatic homogenate. Vials in duplicate for each reaction were sealed and heated in water (water bath) at a temperature of 100°C for 15 min. After heating, the mixture was centrifuged for 10 min., and immediately after the supernatant was separated and the absorbance was measured at 535 nm (Buege and Aust, 1978; Magalhães et al., 2006).

3. Statistical analysis

The descriptive statistic was carried out by using the software Prism 4 from Windows. The values were registered as MEAN $\pm$ SEM. The differences among the groups were analyzed by ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls, with multiple comparison tests. The differences were considered significant in $P < 0.05$.

4. Results

The animals infected with *Schistosoma mansoni* had a reduction in creatinine clearance, increase of urinary volume, elevation of pressure levels, proteinuria, and an

increase of oxidative stress. All these events were more intense in animals that received saline solution at 1%.

4.1 Creatinine clearance

The animals that received a sodium overload had an increase in creatinine clearance, with a statistically significant difference in groups CS and ShS (figure 1A), in relation to their respective controls. At 90 and 120 days of age, no difference was observed in the infected groups and their controls; but at 150 days of age, the difference in the creatinine clearance was statistically significant in groups CS and ShS, in relation to their respective controls. There was also a significant difference of this same group in relation to those of 90 and 120 days of age.

FIGURE 1 HERE

4.2 Evaluation of proteinuria (albumina)

Proteinuria occurred in the four groups of animals studied, at 120 and 150 days of age (figure 1B), with statistical difference in relation to age of 90 days. In groups Sh and ShS, proteinuria was more intense and with significant difference in groups CS and ShS, in relation to their controls at 120 and 150 days of age. In group ShS, a significant difference was observed in relation to the animals of groups C and Sh, at 120 and 150 days of age. Finally, there was proteinuria with significant difference also in groups Sh, CS and ShS, in relation to those of 120 days of age.

4.3 Hepatic and kidney oxidative stress

The oxidative stress was evaluated through lipid peroxidation and estimated through substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), and expressed in nmol of malondialdehyde/g of kidney tissue (Figure 2 A) and of hepatic tissue (Figure 2B). In both, the oxidative stress increased, however, in the kidney tissue the difference was statistically significant in groups CS and ShS, in relation to their respective controls. In the hepatic tissue, the difference was significant in group CS in relation to its control.

FIGURE 2 HERE

4.4 Evaluation of systolic arterial pressure (SAP)

The data presented in figure 3 shows the evolution of the systolic arterial pressure in the three periods in which it was measured. The results are an average of five verifications with intervals of 5 minutes between them. There was an increase in the levels of systolic arterial pressure with statistically significant difference at 90, 120 and 150 days of age, in groups CS and ChS, in relation to their respective controls.

FIGURE 3 HERE

4.5 Evaluation of urinary excretion

The urinary excretion of animals was evaluated in mL/100 g of body weight for 24 h at 90, 120 and 150 days of age (Figure 4). The groups treated with saline solution at 1% had the urinary volume increased, which was expected due to the overload of Na^+ . In the control animals, the urinary volume was inferior, but with an increase in the last two periods in which it was measured. There was an increase in the excretion of protein with significant difference

at 120 and 150 days of age, in relation to that of 90 days in all groups. In groups CS and ChS, there was a significant difference at 120 and 150 days of age, in relation to their controls and in relation to the rats that were not infected. At 150 days of age there was excretion of proteins with significant difference among groups C, CS and ShS, in relation to the animals at 120 days of age.

FIGURE 4 HERE

5. Discussion

The results of this study show that the animals infected by the *Schistosoma mansoni* parasite presented proteinuria, increase in pressure levels and oxidative stress in relation to their respective controls. In animals that received a sodium overload this process was more intense. The creatinine clearance, which measures the estimate of the glomerular filtration rate, was reduced at 150 days of age.

Despite the fact that creatinine is an endogenous biomarker that is widely used to evaluate kidney function, it should not be considered the only parameter in kidney function evaluations because its values can vary depending on some specific factors, such as: diet, age, size of muscle mass and the existence of extra-kidney inflammatory processes (Koenig et al., 2005; Bagshaw and Gibney, 2008).

The animals evaluated were infected with the *Schistosoma mansoni* parasite, triggering an inflammatory reaction, which possibly contributed to an increase in the creatinine tubular secretion. This is a common event in cases of infection (Bagshaw and Gibney, 2008). However, a rat is a semi-permissive animal and particularly in the infection by *shistosoma mansoni*, it eliminates the adult worm after four weeks of infection and develops

an immunological response able to prevent reinfection (Cêtre et al., 1999). The resistance developed by the rat can reduce the possibilities of a more accentuated infections process, and also induce an increase of creatinine secretion by the kidney tubules.

A relevant piece of data is that creatinine clearance suffered alteration only at 150 days of age or 90 days after they were infected – there not being any alterations in the two prior periods in which it was measured – exactly in the most acute phase of the infections process. This suggests that the creatinine values cleansed by the kidney were not necessarily influenced only by the infection of *schistosoma mansoni*, since creatinine is also influenced by age (Eisner et al., 2010; Tonomura et al., 2013), as has already been reported. In humans, a physiological reduction occurs, of nearly 1mL/year after 40 years of age (National Kidney Foundation, 2002). Several authors have reported in experimental studies in rats, that there is a correspondence of 30 days of life of a human for each day of life of a rat (Klee et al., 1990; Iandoli Júnior et al., 2000; Quinn, 2005; Andreollo et al., 2012).

In relation to oxidative stress and the alterations of arterial pressure, the animals that received sodium overload clearly had an elevation in pressure levels (figure 3) and an increase of hepatic and kidney oxidative stress (Figures 2 A and 2 B), aside from also having more intense excretion of protein (Figure 1 B). On the other hand, the animals in the control groups, treated with potable water, had their kidney functions preserved.

The elevated oxidative stress and the proteinuria presented in the animals infected with *Schistosoma mansoni*, suggest that chronic inflammatory processes, as in the case of schistosomiasis, can influence the early increase of pressure levels, as was observed in the animals used in the experiments. This process becomes even more accelerated when an extra quantity of sodium is added to the diet.

The mechanisms involved in kidney disease resulting from alterations in the homeostasis of sodium occur in hemodynamic terms, such as the elevation of intraglomerular hydrostatic pressure (Takenaka et al., 1992), and non-hemodynamic terms, such as the development of inflammatory processes and the elevation of oxidative stress (Lenda et al., 2000; Kitiyakara et al., 2003; Magalhães et al., 2006). The physiopathological mechanism that can explain the loss of proteins by the animals in this study, through the urine, is grounded in a systemic inflammatory process triggered by *Schistosoma mansoni* – which could lead to an endothelial dysfunction and a consequent increase of the capillary permeability, allowing the leaking of albumin through the glomerular membrane (Stuveling et al., 2004; Yuyun et al., 2005; Gray et al., 2010). Moreover, the sodium overload certainly contributed to the elevation of arterial pressure of the animals, as is evident when comparing these animals to those which ingested potable water.

Studies have reported that kidneys of normal rats, when submitted to sodium overload, present early inflammation. A prevailing explanation that explains how the sodium is able to develop the inflammatory response is that the increase of the glomerular filtration rate can harm the oxidation of the kidney tissue, favoring the development of tubulointerstitial inflammation (Rosón et al., 2006). The kidney epithelial cells react in the presence of increased hypoxia, hyperosmolarity, or intracellular dehydration with increased production of reactive oxygen species (ROS). Kidney hypoxia causes an increase of adhesion molecules including cytokines and chemokines, the infiltration of leukocytes, and it elevates the production of reactive oxygen species (ROS) (Swärd et al., 2005; Rosón et al., 2006).

The kidney has an extraordinary capacity to adapt to the arterial pressure variations, and to maintain the cleansing in a constant progression. The arterial pressure suffers constant variation. This demands a dynamic adaptation from the kidney to maintain self-regulation of

the blood flow, as well as the intraglomerular pressure, inducing natriuresis. This kidney response to the arterial pressure variations represents an adaptation to hypertension (Takenaka et al., 1992; Guyton, 2006).

Conclusion

The results of this study showed that the animals infected with *Schistosoma mansoni*, present proteinuria and had their pressure levels and oxidative stress increased. It was evident that this process was more intense in animals that were treated with saline solution at 1%.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support from LIKA (Laboratory of Immunopathology Keizo Asami), UFPE (Federal University of Pernambuco) and UFRPE (Rural Federal University of Pernambuco).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Ahmed, S.A., Gad, M.Z., 1996. Diagnostic value of serum lactate dehydrogenase isoenzyme and amino acid patterns in several schistosomal and non-schistosomal disorders as compared to other biochemical parameters. *Dis. Markers* 13, 19–29.
- Andreollo, N.A., Santos, E.F. dos, Araújo, M.R., Lopes, L.R., 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq. Bras. Cir. Dig.* 25, 49–51.
- Ascenzi, P., Fasano, M., 2010. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys. Chem.* 148, 16–22.

- Bagshaw, S.M., Gibney, R.T.N., 2008. Conventional markers of kidney function. *Crit. Care Med.* 36, S152–8.
- Barsoum, R.S., 1993. Schistosomal glomerulopathies. *Kidney Int.* 44, 1–12.
- Bina, J.C., Prata, A., 2003. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 211–6.
- Bolton, C.H., Downs, L.G., Victory, J.G., Dwight, J.F., Tomson, C.R., Mackness, M.I., Pinkney, J.H., 2001. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol. Dial. Transplant* 16, 1189–97.
- Bucci, M., Roviezzo, F., Posadas, I., Yu, J., Parente, L., Sessa, W.C., Ignarro, L.J., Cirino, G., 2005. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 904–8.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–10.
- Cêtre, C., Pierrot, C., Cocude, C., Lafitte, S., Capron, A., Capron, M., Khalife, J., 1999. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semipermissive rat host. *Infect. Immun.* 67, 2713–9.
- Deanfield, J., Donald, A., Ferri, C., Giannattasio, C., Halcox, J., Halligan, S., Lerman, A., Mancina, G., Oliver, J.J., Pessina, A.C., Rizzoni, D., Rossi, G.P., Salvetti, A., Schiffrin, E.L., Taddei, S., Webb, D.J., 2005. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* 23, 7–17.
- Eisner, C., Faulhaber-Walter, R., Wang, Y., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S.T., Mizel, D., Star, R.A., Briggs, J.P., Levine, M., Schnermann, J., 2010. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int.* 77, 519–26.
- Fella, K., Glückmann, M., Hellmann, J., Karas, M., Kramer, P.-J., Kröger, M., 2005. Use of two-dimensional gel electrophoresis in predictive toxicology: identification of potential early protein biomarkers in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 5, 1914–27.
- Förstermann, U., 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5, 338–49.
- Gray, D.J., McManus, D.P., Li, Y., Williams, G.M., Bergquist, R., Ross, A.G., 2010. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. *Lancet Infect. Dis.* 10, 733–6.

- Guyton, A., 2006. Textbook of medical physiology - 11^a edição. Elsevier saunders. 2006 [WWW Document]. URL <http://vet.uokufa.edu.iq/staff/falah/Textbook of Medical Physiology.pdf>
- Harvie, M., Jordan, T.W., La Flamme, A.C., 2007. Differential liver protein expression during schistosomiasis. *Infect. Immun.* 75, 736–44.
- Iandoli Júnior, D., Nigro, A.J.T., Sementilli, Â., Juliano, Y., Novo, N.F., 2000. Comparação das anastomoses esôfago-gástricas término-terminais em plano único e por invaginação de submucosa e mucosa, em ratos. *Acta Cir. Bras.* 15, 00–00.
- Ibrahim, J., Berk, B.C., Hughes, A.D., 2006. Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 28, 57–72.
- Kharbanda, R.K., Walton, B., Allen, M., Klein, N., Hingorani, A.D., MacAllister, R.J., Vallance, P., 2002. Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin. *Circulation* 105, 2600–4.
- Kitiyakara, C., Chabrashvili, T., Chen, Y., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., Welch, W.J., Wilcox, C.S., 2003. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2775–82.
- Klee, L.W., Hoover, D.M., Mitchell, M.E., Rink, R.C., 1990. Long term effects of gastrocystoplasty in rats. *J. Urol.* 144, 1283–7.
- Koenig, W., Twardella, D., Brenner, H., Rothenbacher, D., 2005. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate. *Clin. Chem.* 51, 321–7.
- Kovacs, I., Toth, J., Tarjan, J., Koller, A., 2006. Correlation of flow mediated dilation with inflammatory markers in patients with impaired cardiac function. Beneficial effects of inhibition of ACE. *Eur. J. Heart Fail.* 8, 451–9.
- Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T.G., Otagiri, M., 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 695–704.
- Kunsch, C., Medford, R.M., 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* 85, 753–66.
- Lenda, D.M., Sauls, B.A., Boegehold, M.A., 2000. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H7–H14.
- Machado, H., Guerra, M.D.O., Peters, V.M., 2010. Implantação e Padronização da Técnica de Aferição Indireta da Pressão Arterial em Ratos Wistar da Colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) 60–61.

- Magalhães, J.C.G., da Silveira, A.B., Mota, D.L., Paixão, A.D.O., 2006. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp. Physiol.* 91, 611–9.
- Mahmoud, O.M., Elsamani, F., Gameel, A.A., Taylor, M.G., 1987. Serum enzyme changes in calves experimentally infected with *Schistosoma bovis*. *J. Comp. Pathol.* 97, 335–9.
- Malkoff, J., 2005. Non-Invasive Blood Pressure for Mice and Rats. Kent Sci. Corp. 1–8.
- Monnink, S.H.J., van Haelst, P.L., van Boven, A.J., Stroes, E.S.G., Tio, R.A., Plokker, T.W.M., Smit, A.J., Veeger, N.J.G.M., Crijns, H.J.G.M., van Gilst, W.H., 2002. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J. Investig. Med.* 50, 19–24.
- Moreels, T.G., Nieuwendijk, R.J., De Man, J.G., De Winter, B.Y., Herman, A.G., Van Marck, E.A., Pelckmans, P.A., 2004. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut* 53, 99–107.
- National, K. foundation, 2002. KDOQI CKD Guidelines - Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification [WWW Document]. Guidelines. URL http://www2.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p5_lab.htm
- Othman, A.A., Shoheib, Z.S., Abdel-Aleem, G.A., Shareef, M.M., 2008. Experimental schistosomal hepatitis: protective effect of coenzyme-Q10 against the state of oxidative stress. *Exp. Parasitol.* 120, 147–55.
- Quinn, R., 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21, 775–7.
- Rosón, M.I., Cavallero, S., Della Penna, S., Cao, G., Gorzalczany, S., Pandolfo, M., Kuprewicz, A., Canessa, O., Toblli, J.E., Fernández, B.E., 2006. Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. *Kidney Int.* 70, 1439–46.
- Salim, E.I., Morimura, K., Menesi, A., El-Lity, M., Fukushima, S., Wanibuchi, H., 2008. Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *Int. J. Cancer* 123, 601–8.
- Stuveling, E.M., Bakker, S.J.L., Hillege, H.L., Burgerhof, J.G.M., de Jong, P.E., Gans, R.O.B., de Zeeuw, D., 2004. C-reactive protein modifies the relationship between blood pressure and microalbuminuria. *Hypertension* 43, 791–6.
- Swärd, K., Valsson, F., Sellgren, J., Ricksten, S.-E., 2005. Differential effects of human atrial natriuretic peptide and furosemide on glomerular filtration rate and renal oxygen consumption in humans. *Intensive Care Med.* 31, 79–85.

- Takenaka, T., Forster, H., De Micheli, A., Epstein, M., 1992. Impaired myogenic responsiveness of renal microvessels in Dahl salt-sensitive rats. *Circ. Res.* 71, 471–480.
- Thome-Kromer, B., Bonk, I., Klatt, M., Nebrich, G., Taufmann, M., Bryant, S., Wacker, U., Köpke, A., 2003. Toward the identification of liver toxicity markers: a proteome study in human cell culture and rats. *Proteomics* 3, 1835–62.
- Tonomura, Y., Morikawa, Y., Takagi, S., Torii, M., Matsubara, M., 2013. Underestimation of urinary biomarker-to-creatinine ratio resulting from age-related gain in muscle mass in rats. *Toxicology* 303, 169–76.
- Yuyun, M.F., Adler, A.I., Wareham, N.J., 2005. What is the evidence that microalbuminuria is a predictor of cardiovascular disease events? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 271–6.

Lista de figuras

Figure 1

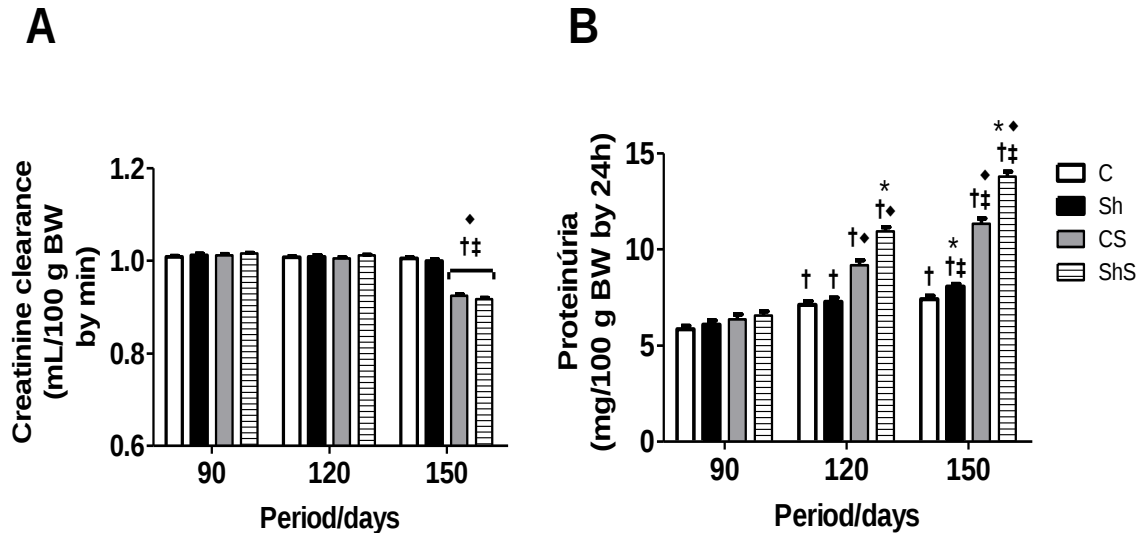


Figure 1. Creatinine clearance of (A) and excretion of urinary protein (B) of rates infected with *Schistosoma mansoni* and their respective controls: at 90, 120 and 150 days of age. The groups were the following: Control with water (C), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Shistosoma with water (Sh), rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Control with saline (CS), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%; and ShS, rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%. BW = body weight. The data is expressed in average $\pm$ SEM. $P < 0.05$: †Vs. rats at 90 days of age; ‡Vs. rats at 120 days of age; *Vs. rats not infected; ♦Vs. rats treated with potable water.

Figure 2

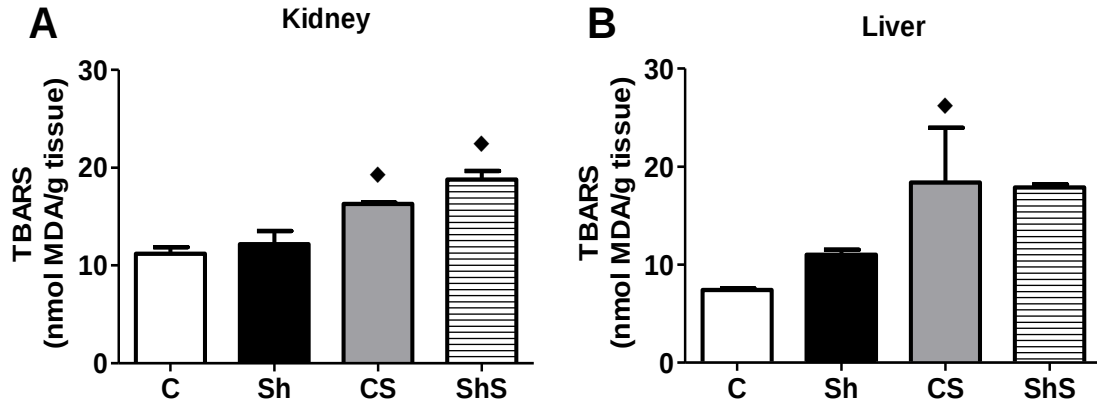


Figure 2. Oxidative stress through tissue lipid peroxidation of rats infected with *Schistosoma mansoni* and their respective controls. The lipid peroxidation was estimated through reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), with measures in kidney (A) and hepatic (B) levels, in rats at 150 days of age. The groups were the following: Control with water (C), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Shistosoma with water (Sh), rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Control with saline (CS), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%; and ShS, rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%. MDA= malondialdehyde. The data is expressed in average $\pm$ SEM. P < 0.05: ♦Vs. rats treated with potable water.

Figure 3

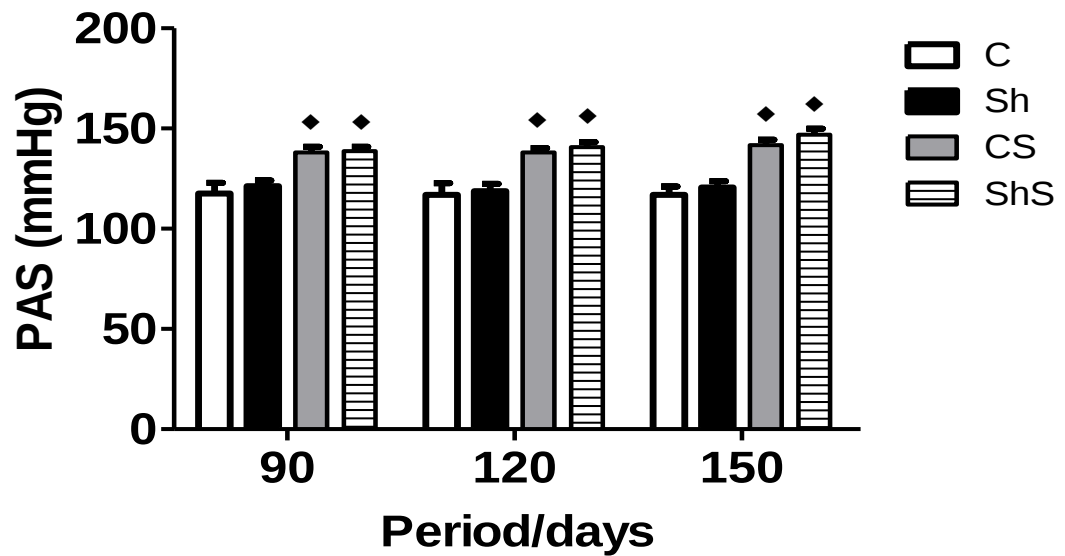


Figure 3. The systolic arterial pressure (SAP) of rats infected with *Schistosoma mansoni* and their respective controls. The systolic arterial pressure was measured by plethysmography with the conscious animals at 90, 120 and 150 days of age. The groups were the following: Control with water (C), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Shistosoma with water (Sh), rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Control with saline (CS), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%; and ShS, rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%. The data is expressed in average $\pm$ SEM. $P < 0.05$: ♦Vs. rats treated with potable water.

Figure 4

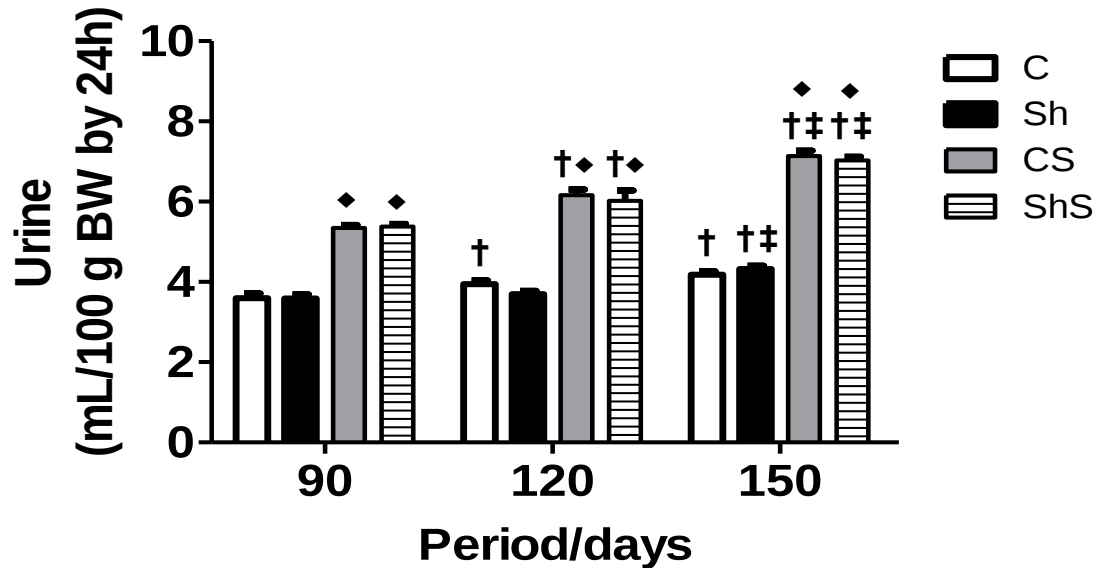


Figure 4. Urinary excretion of rats infected with *Schistosoma mansoni* and their respective controls at 90, 120 and 150 days of age. The groups were the following: Control with water (C), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Shistosoma with water (Sh), rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with potable water; Control with saline (CS), rats not infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%; and ShS, rats infected with *Schistosoma mansoni* treated with saline solution at 1%. BW: body weight. The data is expressed in average $\pm$ SEM. $P < 0.05$: ♦Vs. rats at 90 days of age, ‡Vs. rats at 120 days of age; ♦Vs. rats treated with potable water.

Conclusão

Os resultados obtidos nos experimentos realizados neste estudo permitiram identificar uma correlação entre microalbuminúria e elevação dos níveis pressóricos nos pacientes portadores das formas hepatoesplênica e hepatointestinal da esquistossomose. O número de pacientes que apresentou microalbuminúria foi de 14,61 % da amostra. Este número é significativo se levar em conta o período do estudo que foi de 1 ano. O que sugere a sua utilização como um biomarcador endógeno tanto para avaliação da função renal, como preditor precoce de hipertensão arterial. Porém, mais estudos são necessários para reafirmar esta hipótese. Em relação aos biomarcadores, foi evidente o melhor desempenho da cistatina C sérica em relação à creatinina sérica, demonstrando uma redução mais acentuada da taxa de filtração glomerular. Estes dados reafirmam a sua importância enquanto biomarcador endógeno mais preciso na avaliação da função renal.

O elevado estresse oxidativo e a proteinúria apresentada pelos animais infectados com *Schistosoma mansoni*, sugerem que processos inflamatórios crônicos como no caso o da esquistossomose, podem influenciar no aumento precoce dos níveis pressóricos, observado nos animais utilizados nos experimentos. Este processo se torna ainda mais acelerado quando é adicionada uma quantidade extra de sódio na dieta. Estes resultados são promissores, mas é necessário o desenvolvimento de novos estudos que reafirmem os dados obtidos nesta pesquisa e algumas hipóteses levantadas como por exemplo a substituição da creatinina sérica pela cistatina na avaliação da função renal. Outra hipótese levantada nesta pesquisa é a de que a resposta inflamatória desenvolvida durante a infecção pelo *Shistosoma mansoni* pode predispor ao desenvolvimento de microalbuminúria e consequentemente, aumentar os riscos de desenvolvimento de doença cardiovascular e renal.

Anexos

ORIENTAÇÕES PARA O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor:

Eu, Milton Cezar Compagnon, aluno da pós-graduação em nível doutorado - UFPE, estou desenvolvendo uma pesquisa intitulada: **“Investigação de Microalbuminúria como Preditivo de doença cardiovascular e renal em Pacientes e em um Modelo Experimental Esquistossomóticos”**. A metodologia que será utilizada nesta pesquisa consiste na investigação de microalbuminúria, da filtração glomerular e dos níveis pressóricos. Será realizada em pacientes que são atendidos no Ambulatório de Esquistossomose do Hospital das Clínicas – UFPE. Após confirmação do diagnóstico de esquistossomose mansônica com fibrose periportal, amostras de sangue e da urina serão obtidas de 160 pacientes. A coleta da urina será realizada da seguinte forma: será entregue um frasco coletor de urina estéril para o paciente quando este comparecer ao ambulatório de esquistossomose durante as visitas periódicas. O paciente será orientado a realizar retenção de urina por duas horas antes da coleta. A seguir, o paciente será conduzido a um ambiente fechado e discreto para a coleta de urina. A avaliação da pressão arterial será realizada no ambulatório no decorrer da consulta médica. Serão realizadas duas mensurações com intervalos de 2 minutos entre as medidas. Após a consulta médica, o paciente será encaminhado ao laboratório do hospital de clínicas da UFPE para a coleta de sangue, a qual ocorrerá através de uma punção venosa para retirada de 10 ml de sangue. Em seguida o paciente será liberado. Tendo em vista o caráter asséptico das coletas da urina e sangue, estes procedimentos não oferecem riscos de contaminação para o paciente.

Considerando a necessidade de realização do sumário de urina, os pacientes que apresentarem hematúria e proteinúria, indicadores de nefropatia esquistossomótica, serão encaminhados ao ambulatório de Nefrologia, o que constitui um benefício direto para o indivíduo.

O projeto teve aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do CCS-Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e tem como responsável o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/UFPE e Ana Lúcia Coutinho Domingues – Ambulatório de Esquistossomose, HC/UFPE e está de acordo com a Lei 196/1996 que regulamenta a pesquisa com seres humanos.

Sua participação é de fundamental importância para a realização do projeto. Desta forma, solicito que leia as orientações a seguir concordando ou não em participar desta pesquisa (Em 2 vias por participante-voluntário(a) da pesquisa e pelo responsável, resolução nº 196/96- IV, do CNS).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fui convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo sobre excreção de uma proteína na urina na esquistossomose para calcular a possibilidade de ter hipertensão arterial e recebi da responsável pela parte clínica, Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues, as informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem deixar dúvidas que os **BENEFÍCIOS** consistem em:

- 1) Melhorar os cuidados para prevenir a hipertensão arterial;
- 2) Pesquisar a possibilidade de ter hipertensão arterial;
- 3) Analisar função renal, através da concentração de creatinina e cistatina na urina e no sangue, e também através da concentração de albumina na urina;
- 4) Saber e poder prevenir a hipertensão arterial e compreender melhor as alterações de minha esquistossomose.

Os **RISCOS** consistem em:

- 1) Após a coleta de sangue com material descartável, pode aparecer uma mancha roxa no local da punção por um extravasamento do sangue que será absorvido, sem outros danos à minha saúde física e mental;

Ademais, estou consciente de que:

- 1) Esse estudo começará em julho de 2009 e terminará em julho de 2012;
- 2) Em algumas visitas ao ambulatório serei solicitado para realizar coleta de urina;
- 3) Contarei com a assistência da Dra Ana Lúcia Coutinho Domingues, FONE: 3271-8534 e 3454-3524;
- 4) Sempre que eu desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- 5) Poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer prejuízo ou penalidade;
- 6) As informações conseguidas através de minha participação não permitirão identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

ENDEREÇO DO(A) PARTICIPANTE-VOLUNTÁRIO(A):

Domicílio _____

Bloco: _____ Complemento: _____ Bairro: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Estado(UF): _____ Fone: _____

Endereço do(s) responsável(is) pela pesquisa:

Instituição: HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFPE

Endereço: AV. PROF. MORAIS RÊGO S/N, CDU, BLOCO F, 3º ANDAR

Telefone para contato: 2126-3725/2126-3524/2126-8534

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares/ danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, Centro de Ciências da Saúde, 3º andar, UFPE – CDU – RECIFE – PE.

Fone: 2126-8538.

Eu _____após ter lido as orientações contidas neste termo de consentimento livre esclarecido, declaro ter compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos benefícios que a minha participação implicam para mim e para outros esquistossomóticos, concordo em participar e DOU MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão datiloscópica do(a) voluntário(a) ou responsável legal

Assinatura do responsável pelo estudo(rubricar nas demais páginas)

Imagem 1. Acondicionamento na caixa de contenção



Pletismografia de cauda

Imagem 2. Armazenamento de tecido de animais



Armazenamento de rim, fígado e baço em solução metacarn (ácido acético glacial, clorofórmio e metanol) e álcool para estudos complementares