



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

THAYSA CAROLINA GONÇALVES SILVA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA  
DO GENE DA METALOPROTEINASE *MMP-3* (-1171 5A/ 6A) NA FIBROSE  
PERIportal DE ESQUISTOSSOMÓTICOS EM PERNAMBUCO.**

Recife-PE

2024

THAYSA CAROLINA GONÇALVES SILVA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA  
DO GENE DA METALOPROTEINASE *MMP-3* (-1171 5A/ 6A) NA FIBROSE  
PERIportal DE ESQUISTOSSOMÓTICOS EM PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador (a): Ana Lúcia Coutinho Domingues

Coorientador (a): Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife-PE

2024

## Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Thaysa Carolina Gonçalves.

Avaliação da influência de polimorfismos da região promotora do gene da metaloproteinase MMP-3 (-1171 5A/ 6A) na fibrose periportal de esquistossomóticos em Pernambuco / Thaysa Carolina Gonçalves Silva. - Recife, 2024.

85f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Ana Lúcia Coutinho Domingues.

Coorientação: Maria Tereza Cartaxo Muniz.

Inclui referências.

1. Esquistossomose Mansonii; 2. Fibrose Periportal; 3. Polimorfismos; 4. Metaloproteinases; 5. MMP-3. I. Domingues, Ana Lúcia Coutinho. II. Muniz, Maria Tereza Cartaxo. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

---

**THAYSA CAROLINA GONÇALVES SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO  
PROMOTORA DO GENE DA METALOPROTEINASE MMP-3 (-1171 5A/ 6A)  
NA FIBROSE PERIportal DE ESQUISTOSSOMÓTICOS EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 01/03/2024.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Profa. Dra. Ana Virgínia Matos Sá Barreto, (Examinadora Externa)  
Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU)

---

Profa. Dra. Juliana Prado Gonçalves, (Examinadora Externa)  
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE)

Dedico este trabalho a meus pais e tia Tânia, pelo  
incentivo e incansável apoio ofertado.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pelo discernimento atribuído a mim para trilhar esse caminho e por me dar a graça de realizar essa pesquisa. À Nossa Senhora de Lourdes, que me acolheu há alguns anos e tem sido meu colo em todos os momentos de cansaço.

A mim, por todos os momentos em que precisei ser resiliente e por não desistir.

A minha mãe Sandra e tia Tânia, que sempre foram exemplos de mulheres de garra e resiliência, suas histórias de vida me inspiram. Vocês duas sempre me mostraram que a educação abre portas. Obrigada por todo apoio e pelos sacrifícios realizados, eu serei eternamente grata.

A meu pai Tarcizio, que é meu exemplo de calma e paciência. Sua forma de lidar com as adversidades me impressiona. Obrigada por confiar e acreditar em mim. Eu amo vocês, obrigada por entender minha ausência quando foi necessário.

A Lucas Queiroz, meu namorado, parceiro e melhor amigo. Nessa batalha acadêmica desde 2017, você foi em quem me apoiei para continuar seguindo. Obrigada pelo cuidado, pelo apoio e pelos vários chocolates ao longo desse processo. Eu amo você.

Agradeço a minha orientadora Dra. Ana Lúcia pela oportunidade e pelos conhecimentos repassados, sua dedicação à pesquisa, à Medicina e aos pacientes é admirável. Minha coorientadora, Dra. Tereza Cartaxo pela parceria e disponibilidade do laboratório. A Dr. Edmundo Lopes pelos conhecimentos compartilhados e por todas as sugestões. A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica, Dra. Edileine Delalibera, Dra. Elker Lene e Matheus Carvalho pela parceria, disponibilidade e discussões. A Paula Valença, pelas incansáveis correções, sugestões, reuniões e por todo conhecimento que compartilhamos.

Aos meus fiéis amigos, pelos momentos felizes e pelo apoio, especialmente, a Geo, Thami, Ju, Heytor e Rute, obrigada por tanto. A Dani, por todas as sextas-feiras às 11h. A Amanda Gabriela e Caroline Louise, vocês foram incríveis nessa caminhada do mestrado, a área acadêmica é por vezes solitária e ter vocês comigo tornou-a um pouco mais fácil.

A todos os pacientes envolvidos nessa pesquisa, tratei todas as suas amostras como deveriam ser tratadas: com cuidado, respeito e lembrando que existem vidas por trás delas. Por fim, à CAPES pelo suporte financeiro.

*Quem tenta incessantemente, alcança.*  
**Castelo de um quarto só - Renato da Rocinha**

## RESUMO

Na esquistossomose mansoni, a fibrose periportal (FPP) é resultante de uma reação inflamatória intensa em razão da permanência de ovos do parasita no espaço portal, caracterizada pela deposição de colágeno e proteínas da matriz extracelular. Esta fibrose é o resultado de um processo de síntese e degradação da matriz extracelular (MEC), que conta com a ação das metaloproteinases. Polimorfismos da região promotora dos genes das metaloproteinases influenciam na expressão gênica e podem causar desequilíbrio na síntese e degradação da MEC. Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi determinar associação entre o polimorfismo da região promotora do *MMP-3* (-1171 6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal de pacientes com a forma hepatoesplênica e FPP (padrão E ou F) comparados à pacientes com a forma hepatointestinal e FPP padrão (A, B ou C). As amostras de DNA utilizadas foram submetidas à ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase, seguido de polimorfismos de fragmentos de restrição de comprimento (RFLP), com digestão por enzima de restrição *Psyl* para análise da associação entre os polimorfismos e a gravidade da fibrose periportal. A casuística foi formada por 242 pacientes com esquistossomose mansoni divididos em dois grupos, sendo o grupo 1 formado por 123 pacientes com a forma hepatoesplênica (padrão E ou F de fibrose) e o grupo 2 formado de 119 pacientes com a forma hepatointestinal (padrão A, B ou C de fibrose), diagnosticados por meio de ultrassonografia de abdome. Houve associação entre o sexo masculino e a forma hepatoesplênica (1,7623 IC 95% [1,0481-2,9631]; p-valor = 0,0439), bem como, indivíduos com idade acima de 41 anos, também apresentaram uma maior chance de desenvolver esta forma clínica da doença (OR= 2,8299; IC 95% [1,5211-5,2650]; p-valor= 0,0014), com maior ênfase em indivíduos acima de 61 anos (OR= 8,5541; IC 95% [3,6895-19,8326], p-valor= 0,0000). Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo 5A/6A *MMP-3* entre os grupos clínicos HI e HE 5A/6A IC [0,7144-1,9879] p-valor 0,5882 5A/5A IC [0,0912-2,9231] p-valor 0,7331 5A/6A / 5A/5A IC [0,6904-1,8937] p-valor 0,6949). Os resultados encontrados indicam que não há associação entre o polimorfismo *MMP-3* (5A>6A) e o desenvolvimento de padrões mais graves da FPP, entretanto, novos estudos são necessários para melhor compreensão do impacto desse polimorfismo. Além disso, o sexo masculino e idade acima de 41 anos foram fatores preditivos para forma HE da doença, nesta população brasileira.

**Palavras-chave:** esquistossomose mansoni; fibrose periportal; polimorfismos; metaloproteinases; *MMP-3*.

## ABSTRACT

In schistosomiasis mansoni, periportal fibrosis (PPF) results from an intense inflammatory reaction due to parasite eggs in the portal space, characterized by the deposition of collagen and extracellular matrix proteins. This fibrosis is the outcome of a process of synthesis and degradation of the extracellular matrix (ECM), which involves the action of metalloproteinases. Polymorphisms in the promoter region of metalloproteinase genes influence gene expression and can cause an imbalance in ECM synthesis and degradation. Therefore, this research aimed to determine the association between the polymorphism in the promoter region of MMP-3 (6A/5A) and the severity of periportal fibrosis in patients with hepatosplenic form and PPF (pattern E or F) compared to patients with hepatointestinal form and PPF pattern (A, B, or C). DNA samples were subjected to Polymerase Chain Reaction assays, followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), with restriction enzyme digestion by PstI for analysis of the association between polymorphisms and the severity of periportal fibrosis. The sample consisted of 242 patients with schistosomiasis mansoni divided into two groups, with group 1 comprising 123 patients with hepatosplenic form (pattern E or F of fibrosis) and group 2 comprising 119 patients with hepatointestinal form (pattern A, B, or C of fibrosis), diagnosed by abdominal ultrasound. There was an association between male gender and the hepatosplenic form (OR = 1.7623 95% CI [1.0481-2.9631]; p-value = 0.0439) as well as individuals aged above 41 years, who also had a higher chance of developing this clinical form of the disease (OR= 2.8299; 95% CI [1.5211-5.2650]; p-value= 0.0014), with a stronger emphasis on individuals above 61 years (OR= 8.5541; 95% CI [3.6895-19.8326], p-value= 0.0000). There was no statistically significant association between the MMP-3 5A/6A polymorphism among the HI and HE clinical groups (5A/6A CI [0.7144-1.9879] p-value 0.5882 5A/5A CI [0.0912-2.9231] p-value 0.7331 5A/6A / 5A/5A CI [0.6904-1.8937] p-value 0.6949). The findings indicate that there is no association between the MMP-3 (5A>6A) polymorphism and the development of more severe patterns of periportal fibrosis. However, further studies are necessary to understand the impact of this polymorphism better. Additionally, male gender and age above 41 years were predictive factors for the hepatosplenic form of the disease in this Brazilian population.

**Keywords:** schistosomiasis mansoni; periportal fibrosis; polymorphism; metalloproteinases; MMP-3

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Proporção da população global que necessita de 18  
quimioterapia preventiva contra a esquistossomose, 2018.
- Figura 2 – Distribuição das espécies causadoras da esquistossomose 19  
no mundo.

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                     |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Definição e categorização da variável dependente                                                                                    | 31 |
| Tabela 2 – | Definição e categorização das variáveis sociodemográficas                                                                           | 32 |
| Tabela 3 – | Definição e categorização das variáveis laboratoriais                                                                               | 32 |
| Tabela 4 – | Sequências dos <i>primers</i> utilizados na análise do polimorfismo do gene <i>MMP-3</i> de acordo com Gnasso <i>et al.</i> (2000). | 35 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                             |
|---------------|---------------------------------------------|
| ALT           | Alanina aminotransferase                    |
| AST           | Aspartato aminotransferase                  |
| CTGF          | Fator de crescimento do tecido conjuntivo   |
| EHE           | Esquistossomose Hepatoesplênica             |
| EHI           | Esquistossomose Hepatointestinal            |
| ELISA         | Ensaio de imunoabsorção enzimática          |
| EM            | Esquistossomose mansoni                     |
| FFP           | Fibrose periportal                          |
| GGT           | Gamaglutamiltransferase                     |
| HDA           | Hemorragia Digestiva Alta                   |
| HSCs          | Células estreladas hepáticas                |
| IL-6          | Interleucina 6                              |
| IL-1 $\alpha$ | Interleucina 1 alfa                         |
| KK            | Kato-Katz                                   |
| MEC           | Matriz extracelular                         |
| MMPs          | Metaloproteinases                           |
| MMP-1         | Metaloproteinase-1                          |
| MMP-3         | Metaloproteinase-3                          |
| PDGF          | Fator de crescimento derivado das plaquetas |
| PZQ           | Praziquantel                                |
| TGF- $\beta$  | Fator de transformação de crescimento beta  |
| TIMPs         | Inibidores tissulares de metaloproteinases  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa               |

## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                                                                |           |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                              | <b>17</b> |
| 2     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                                                                                   | <b>18</b> |
| 2.1   | CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA ESQUISTOSSOMOSE                                                                                                                      | 18        |
| 2.2   | MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE                                                                                                                      | 21        |
| 2.3   | DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE                                                                                                                                 | 23        |
| 2.4   | TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE                                                                                                                                  | 24        |
| 2.5   | MECANISMOS DA FIBROSE HEPÁTICA                                                                                                                                 | 25        |
| 2.6   | METALOPROTEINASES                                                                                                                                              | 27        |
| 4     | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                                               | <b>28</b> |
| 4.1   | OBJETIVO GERAL                                                                                                                                                 | 28        |
| 4.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                                                                          | 28        |
| 5     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                     | <b>29</b> |
| 5.1   | DESENHO DO ESTUDO                                                                                                                                              | 30        |
| 5.2   | POPULAÇÃO E ÁREA DE ABRANGÊNCIA                                                                                                                                | 28        |
| 5.3   | AMOSTRAGEM                                                                                                                                                     | 30        |
| 5.4   | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO                                                                                                                               | 31        |
| 5.5   | DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS                                                                                                                        | 31        |
| 5.6   | OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA                                                                                                                                  | 32        |
| 5.6.1 | <b>Recrutamento e acompanhamento</b>                                                                                                                           | <b>32</b> |
| 5.6.2 | <b>Coleta de material biológico</b>                                                                                                                            | <b>34</b> |
| 5.6.3 | <b>Extração de DNA genômico</b>                                                                                                                                | <b>34</b> |
| 5.6.4 | <b>Reação em cadeia da Polimerase</b>                                                                                                                          | <b>34</b> |
| 5.6.5 | <b>Digestão por enzima de restrição</b>                                                                                                                        | <b>35</b> |
| 6     | <b>ANÁLISE DE DADOS</b>                                                                                                                                        | <b>35</b> |
| 7     | <b>LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS</b>                                                                                                                                | <b>36</b> |
| 8     | <b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>                                                                                                                                    | <b>36</b> |
| 9     | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                                                              | <b>40</b> |
| 9.1   | <b>Artigo:</b> Influência do polimorfismo metaloproteinase-3 (-1171 5A>6A) na fibrose periportal em pacientes com esquistossomose mansoni, Pernambuco, Brasil. | 40        |

|    |                                                                                            |    |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10 | <b>CONCLUSÕES</b>                                                                          | 55 |
| 11 | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                | 55 |
|    | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                         | 57 |
|    | <b>APÊNDICE A</b> - Versão em língua inglesa do artigo 01 submetido à Revista Acta Tropica | 66 |
|    | <b>ANEXO A</b> – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa                       | 77 |
|    | <b>ANEXO B</b> – Comprovante de submissão à Revista Acta Tropica                           | 82 |
|    | <b>ANEXO C</b> – Normas da Revista Acta Tropica                                            | 83 |

## 1 INTRODUÇÃO

Polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteinases (MMPs) foram descritos previamente na posição -1607 1G/2G da *MMP-1* (Dunleavey *et al.*, 2000), e na região promotora do gene *MMP-3* 5A / 6A na posição -1171 (Gnasso *et al.*, 2000) associados a gravidade em doenças hepáticas, porém não há descrição a respeito da associação desses polimorfismos na fibrose periportal de indivíduos com esquistossomose. Em razão da participação destas metaloproteinases no processo de degradação da fibrose hepática (Shin *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008), esses polimorfismos podem estar associados ao desenvolvimento de padrões mais avançados da fibrose periportal em esquistossomóticos.

Há relato de que polimorfismos dos genes *MMP-1* (1G/2G) e *MMP-3* (-1171 5A/6A), assim como outras metaloproteinases são responsáveis por parte da variabilidade na progressão de doenças hepáticas crônicas. Okamoto *et al.* (2005) analisaram 91 pacientes com hepatite crônica e 89 pacientes com cirrose hepática e demonstraram que portadores do 5A *MMP-3* obtiveram o diagnóstico de cirrose hepática mais cedo em comparação com os homozigotos 6A, e no gene *MMP-1* mais indivíduos do grupo com cirrose hepática foram homozigotos 2G quando comparados ao grupo com hepatite crônica.

A presença do 5A *MMP-3* em pacientes com outras hepatopatias, como carcinoma hepatocelular e colangite esclerosante primária já foi descrita uma associação com a progressão e pior prognóstico dessas doenças (Satsangi, *et al.*, 2001; Okamoto, *et al.*, 2005). Não há relatos na literatura sobre a associação do polimorfismo da *MMP-3* em relação a fibrose periportal em indivíduos com esquistossomose, o que demonstra a necessidade de se elucidar o impacto do polimorfismo *MMP-3* (5A / 6A) na fibrose periportal.

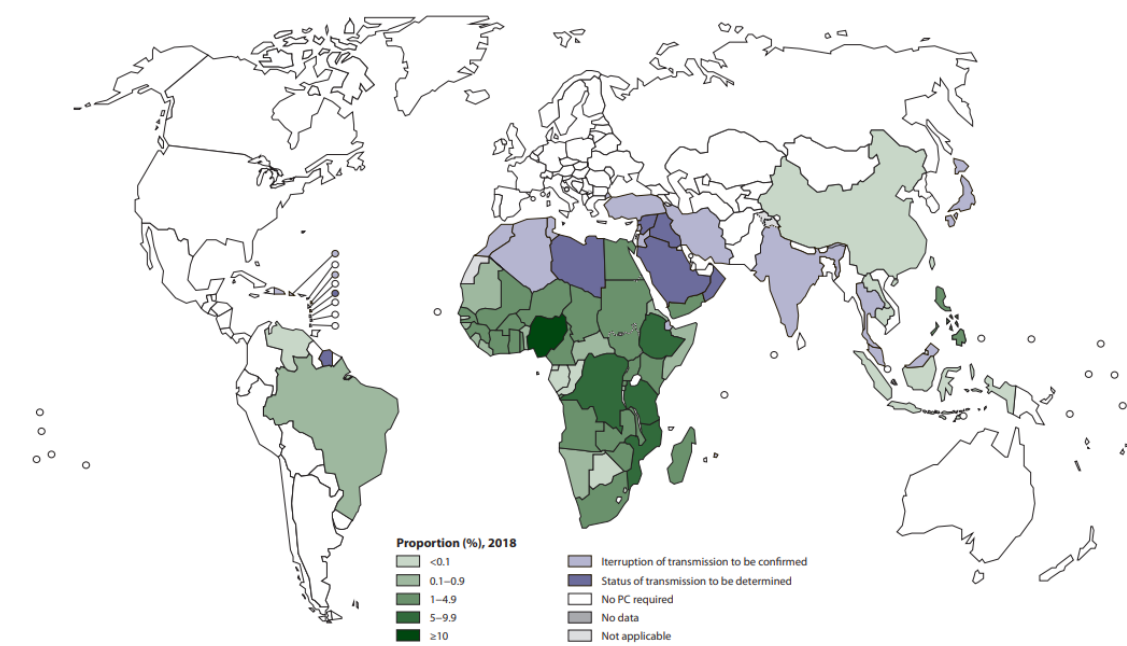
Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo da região promotora do gene da *MMP-3* (-1171 6A/5A) em indivíduos com esquistossomose mansoni no estado de Pernambuco, que desenvolveram a forma hepatoesplênica com fibrose hepática avançada padrão E ou F quando comparados à indivíduos que desenvolveram a forma hepatointestinal com fibrose hepática padrão A, B ou C.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA ESQUISTOSSOMOSE

Distribuída mundialmente, a esquistossomose é uma infecção parasitária de veiculação hídrica considerada um grave problema de saúde pública mundial e é uma das doenças tropicais negligenciadas (Brasil, 2014). Globalmente, é a principal doença transmitida por gastrópodes de água doce e está presente em 78 países, onde 66.7% (52/78) desses 78 são considerados endêmicos (WHO, 2018). Além disso, há uma estimativa de 240 milhões de indivíduos infectados e outros 700 milhões estão em risco de transmissão em todo mundo (WHO, 2018) (Figura 1).

**Figura 1:** Proporção da população global que necessita de quimioterapia preventiva contra a esquistossomose, 2018



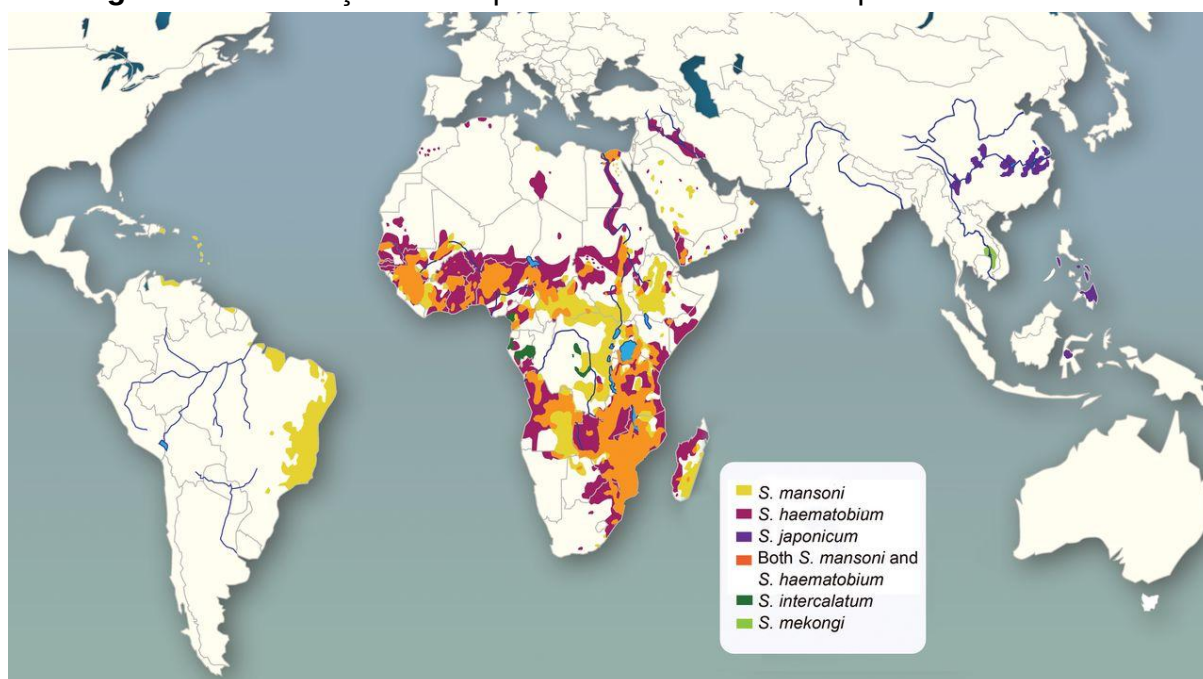
**Fonte:** WHO, 2018 Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis> Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

Apesar da aplicação de medidas de controle, a esquistossomose mansoni (EM) continua sendo uma problemática para a saúde pública brasileira. O último inquérito parasitológico realizado no Brasil entre os anos de 2010 e 2015, apresentou redução significativa no número de casos positivos (Katz, 2018), porém, devido a ineficiência dos métodos de diagnóstico utilizados em inquéritos, estudos mostram que a situação epidemiológica é subestimada (Melo, 2019; Nacife *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

A esquistossomose é provocada pelos parasitas do gênero *Schistosoma* e tem como hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, sendo as espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* consideradas hospedeiros do *Schistosoma mansoni* (Colley *et al.*, 2014). No Brasil, a doença é causada unicamente pelo *Schistosoma mansoni* (Figura 2) e está localizada em 19 estados, sendo sete deles (Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Paraíba, Maranhão e Rio Grande do Norte) localizados na região do Nordeste e dois (Espírito Santo e Minas Gerais) na região sudeste (Brasil, 2014).

No Nordeste brasileiro, entre os anos de 2000 e 2019, 9.276 óbitos foram relacionados à esquistossomose, destes casos, a maior proporção (53.9%) de óbitos foram do estado de Pernambuco, também foram encontrados aumento na taxa de mortalidade no estado de Sergipe (Silva *et al.*, 2022), o que indica a persistência de altas taxas de mortalidade, principalmente nas áreas litorâneas.

**Figura 2:** Distribuição das espécies causadoras da esquistossomose no mundo



Fonte: Weerakoon *et al.* 2015

Os caramujos *Biomphalaria* estão amplamente distribuídos no estado de Pernambuco, se concentrando em áreas da Zona da Mata e na Região Metropolitana do Recife, e apesar de sua distribuição lenta, é acrescida a novas localidades, conferindo à doença um caráter expansivo (Gomes *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2016).

No litoral do estado é frequente os registros de caramujos, principalmente da espécie *B. glabrata*, que foram identificados ao longo de toda extensão da costa litorânea de Pernambuco (Gomes *et al.*, 2012).

Essa ampla distribuição de caramujos *B. glabrata* e de outras espécies como a *B. straminea* ao longo das áreas urbanas pernambucanas, demonstra a perda de caráter rural que existia no estado. Com a expansão dos focos de transmissão para essas áreas, entende-se que a doença não está associada somente a atividades laborais de regiões rurais, mas também a condições ambientais e socioeconômicas presentes em bairros periféricos sem acesso a situações ideais de saneamento básico, conferindo a ela um caráter urbano-rural (Barbosa *et al.*, 2018).

No município de Ipojuca, a localidade Porto de Galinhas, apesar das taxas de infecção dos caramujos ter diminuído de 16.1% para 5,8% em 2010, estudo recente observou o aumento da taxa para 7,2% em 2020, demonstrando que a doença permanece sendo transmitida na localidade e devido ao processo de urbanização desordenado, os habitantes da localidade estão expostos à infecção pelo parasita ao caminhar em ruas não pavimentadas e alagadas (Gomes *et al.*, 2022).

Esse novo perfil epidemiológico pode ser encontrado em outras localidades, como Vitória de Santo Antão, também em Pernambuco, onde 22 criadouros da espécie *B. straminea* foram encontrados, sendo sete deles classificados como focos potenciais e 1 como foco de transmissão, descrito como um canal de esgoto a céu aberto, expondo a população a risco de infecção acidental (Gomes *et al.*, 2016). Em Apipucos, bairro localizado em Recife, Pernambuco foram coletados 77 caramujos *B. straminea*, dos quais 21 foram positivos para *S. mansoni*, além da detecção de coliformes fecais em todas as áreas de coleta (Loyo, *et al.*, 2016).

Mesmo com a descontinuidade das medidas de controle do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), foi possível observar reduções nas taxas de prevalência e carga parasitária em cidades endêmicas (Silva *et al.*, 2019), porém a mudança no perfil epidemiológico da esquistossomose, o surgimento de locais de transmissão urbana e a dificuldade de diagnóstico em áreas com baixa endemicidade, são fatores que representam desafios para o controle e prevenção de novos casos (Barreto *et al.*, 2016; Silva-Filho *et al.*, 2017) .

## 2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE

A EM é classificada em duas fases que correspondem ao estágio de desenvolvimento fisiopatológico do parasita no humano: uma aguda, que ocorre nos estágios iniciais da infecção e uma fase crônica, alcançada com a evolução clínica da doença (Gryseels, 2012), os sintomas ao longo dessa evolução clínica podem variar desde formas assintomáticas até mais graves.

Um prazo para a diferenciação entre a esquistossomose aguda e a fase crônica da doença nunca foi definido com precisão, porém, o tempo de 10 a 12 semanas contanto a partir do momento da exposição, é aceito para separar as duas fases clínicas da doença (Colley *et al.*, 2014). A fase aguda é caracterizada pela presença de dores de cabeça, febre, tosse, fadiga, dores abdominais e a dermatite cercariana, que inicia logo após a penetração das cercárias na pele do hospedeiro e presença local dos esquistossômulos, principalmente em indivíduos nunca expostos antes (Brasil, 2014).

A esquistossomose aguda é dividida em duas fases, a pré-postural, também chamada de pré-patente, que ocorre antes da oviposição pelos vermes adultos; e a fase pós-postural que acontece quando a fêmea do verme adulto, após o acasalamento, passa a liberar os ovos (Melo; Coelho, 2010).

Na fase pré-postural não é possível encontrar ovos do parasita nas fezes do indivíduo infectado, que apresenta quadro febril, dores no corpo, cefaleia ou sintomas respiratórios com tosse seca, além de quadro de cólicas e diarreia. Devido a ampla gama de sintomas clínicos, muitos deles são difíceis de distinguir dos de outras doenças. Após a primeira oviposição, inicia o período pós postural da fase aguda, onde a febre agrava, juntamente com a intensidade da diarreia muco sanguinolenta, tosse persistente, alterações pulmonares, anorexia, hepatoesplenomegalia, eosinofilia e níveis elevados de IgE (Loverde, 2019).

Durante a fase aguda, a reação inflamatória é bem estabelecida e envolve, predominantemente, os linfócitos Th1, quando os níveis de imunoglobulina estão elevados e hipereosinofilia, após a postura dos ovos, a resposta inflamatória altera, sendo predominantemente Th2 (Pereira *et al.*, 2010). Essa fase dura, em torno, de dois a três meses e os seus sintomas tendem a desaparecer com o tratamento ou de forma espontânea, nesse caso, os indivíduos não tratados podem evoluir para a fase crônica e desenvolver sinais graves da doença (Colley, 2014).

A forma crônica da esquistossomose caracteriza-se pela formação de granulomas induzida pelos ovos transportados para diferentes tecidos, produzindo inflamação e fibrose (Salvana *et al.*, 2008). As formas digestivas são subdivididas em: hepatointestinal (HI), hepática e hepatoesplênica (HE) (Brasil, 2014).

A forma clínica hepatointestinal da EM é caracterizada pela passagem de ovos ao longo do tecido intestinal, assim como a possibilidade de ficarem presos na mucosa, induzindo inflamação granulomatosa da mucosa, com presença de micro ulcerações e sangramento superficial (Chen, 2014). Dores abdominais, perda de apetite e diarreia são sintomas comuns apresentados por pacientes com a forma EHI (Loverde, 2019).

Além da passagem pela mucosa intestinal, uma porção dos ovos do *S. mansoni* é carregada pelo fluxo sanguíneo das veias mesentéricas para os ramos portais intra-hepáticos, onde ficam presos, nos ramos terminais ao nível dos espaços portais, causando a formação de granulomas ao seu redor e em alguns casos pode ocorrer fibrose hepática leve (Wilson *et al.*, 2010). A forma hepática é caracterizada por granulomas hepáticos e a presença de fibrose periportal moderada ou raramente avançada, sem esplenomegalia, podendo ou não apresentar varizes esofágicas e quando apresenta, são de fino calibre (Gomes *et al.* 2017). Em infecções com alta carga parasitária ocorre aumento da fibrose periportal e conseqüentemente, hepatoesplenomegalia, caracterizando a forma hepatoesplênica (McManus *et al.*, 2018).

A esquistossomose hepatoesplênica (EHE) é classificada em formas compensada e descompensada. A forma compensada é caracterizada por hepatomegalia associada à hipertensão portal e esplenomegalia que podem estar relacionadas com quadros hemorrágicos (hemorragia digestiva alta - HDA), hematêmese e melena, além dos sintomas já relatados na forma intestinal (Lambertucci *et al.*, 2005). Já a forma descompensada está associada a outros fatores além dos surtos de hemorragia digestiva como, diminuição da funcionalidade do fígado, isquemia hepática, ascite, icterícia e encefalopatia (Brasil, 2014).

### 2.3 DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE

No diagnóstico clínico deve ser realizada uma anamnese minuciosa, incluindo sinais e sintomas informações sobre a história clínica e epidemiológica do indivíduo, como naturalidade, procedência, exposição à água com potencial de contaminação e viagens a áreas endêmicas (Brasil, 2014; Mahmoud *et al.*, 2008).

A avaliação laboratorial deve ser realizada em casos suspeitos da doença, baseada nos dados clínicos e o histórico epidemiológico do indivíduo. Existem diversos métodos de diagnóstico laboratorial para confirmação da esquistossomose e podem variar desde análise microscópica até abordagens moleculares (Cai *et al.*, 2019).

Existe o diagnóstico laboratorial é necessário verificar se o indivíduo é portador ativo do parasita adulto com eliminação de ovos nas fezes, e o diagnóstico da morbidade, que consiste em verificar as alterações provocadas pela parasitose. Sua forma clínica, se tem FPP, e as diversas outras alterações provocadas pela doença (Gomes *et al.* 2017).

O exame parasitológico de fezes pelo método de Kato-Katz (KK) é o método sugerido pela OMS, para diagnóstico do *S. mansoni*, tem como base a análise quantitativa dos ovos, permitindo a inferência da carga parasitária do indivíduo. Outro método de diagnóstico é o Hoffman, Pons e Janer, baseado na sedimentação dos ovos e observação microscópica dos ovos (Brasil, 2014).

Apesar de eficaz e específica quando se trata de áreas com altas taxas de prevalência, a eficiência do KK diminui em áreas de baixa endemicidade, dificultando o diagnóstico laboratorial. Assim, é recomendável a realização de maior número de amostras, três amostras sequenciadas, coletadas com intervalo máximo de 10 dias entre a primeira e a última coleta e leitura de múltiplas (2) lâminas, numa mesma amostra de fezes de KK (Brasil, 2006; Gomes *et al.* 2017).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) tem se mostrado um método adequado para aplicação em estudos populacionais, selecionando os prováveis pacientes positivos, em áreas de baixa carga parasitária, porém sua aplicação na rotina laboratorial, ainda é limitada (Cai *et al.*, 2019). Outros exames laboratoriais podem ser utilizados para o diagnóstico da morbidade da esquistossomose e maior compreensão do caso clínico do indivíduo: hemograma, dosagens séricas de ALT, AST, GGT e outros marcadores bioquímicos e sorológicos.

Durante a fase aguda, indivíduos podem apresentar leucocitose, com níveis de eosinófilos elevados e anemia normocítica ou microcítica e hipocrômica podem ser vistas na forma HE compensada (Lambertucci *et al.*, 2005). Em razão da redução da função hepática e aumento da fibrose hepática, podem ocorrer anormalidades em alguns testes de avaliação hepática como aumento dos níveis séricos de ALT, AST, GGT, bilirrubina total (Leite *et al.*, 2013) e níveis excessivos de D-dímero, que podem indicar hiper fibrinólise e predispor os indivíduos a sangramento gastrointestinal. A redução na contagem de plaquetas em indivíduos com padrões C, D, E e F de fibrose periportal também já foi relatada, e tem relação com esplenomegalia e hiperesplenismo (Medeiros, 2014).

A observação do fígado e do baço é crucial para compreensão do risco de complicações. A avaliação ultrassonográfica da fibrose periportal é um método simples e não invasivo, e considerado o melhor método para avaliar a morbidade nas formas crônicas da EM (Prata *et al.*, 2010; Gomes *et al.* 2017), em contraste da biópsia hepática que não é utilizado rotineiramente por ser um método invasivo (Voietta *et al.*, 2010). A análise ultrassonográfica da fibrose em pacientes esquistossomóticos é feita por meio da avaliação do padrão de FPP e medição da espessura dos ramos internos da veia porta intra-hepática. A análise da fibrose periportal é obtida por meio da classificação de Niamey, que considera seis padrões de fibrose periportal: A (ausência de fibrose); B (fibrose duvidosa); C (leve); D (moderada); E (avançada); e F (muito avançada); (Richter *et al.*, 2001; Gomes *et al.* 2017).

## 2.4 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose ativa deve ser tratada com medicamentos anti-helmínticos com substâncias capazes de atingir o parasito. A principal forma de tratamento utilizada para a esquistossomose, atualmente, é o praziquantel (PZQ), sendo a droga de escolha por se apresentar como anti-helmíntico de alto espectro, que permite o tratamento de todas as espécies conhecidas de *Schistosoma* e espécies de cestóides e trematódeos (Farias, 2013).

Ao ser introduzido como tratamento alternativo, o PZQ tinha custo alto, o que se tornou um obstáculo para a sua distribuição em massa, entretanto, em 1983 a empresa Shin A Poong acessou o mercado com um novo processo que provocou redução considerável nos preços (Cioli *et al.*, 2014).

A ação esquistossomicida do PZQ ocorre dentro de 15 minutos após sua administração, atuando diretamente na permeabilidade ao cálcio nas células do verme adulto, provocando vacuolização e destruição tegumentar, seguida de morte do parasito (Meister *et al.*, 2016), além de inibir, em pequenas concentrações, a produção de ovos pela fêmea do parasita (Santos, 2011). O acompanhamento do tratamento e cura é realizado com três exames parasitológicos no quarto mês após o tratamento (Brasil, 2014).

Apesar do PZQ ser utilizado como primeira opção terapêutica para tratamento da esquistossomose, há relatos de aparecimento de resistência em algumas cepas, o que demonstra a necessidade de investigação de novos anti-helmínticos (Carvalho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2014). O principal alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos é o tegumento do parasita, que tem extrema importância como barreira contra o sistema imune do hospedeiro (Moraes, 2012).

Além do tratamento medicamentoso, pacientes que desenvolvem as formas crônicas da esquistossomose podem apresentar hipertensão portal e sangramento em razão de varizes esofagogástricas, portanto devem ser submetidos a tratamento endoscópico ou cirúrgico através de esplenectomia e desvascularização esofagogástrica ou a ligadura das varizes esofágicas (Leite *et al.*, 2013), cada caso deve ser avaliado individualmente. Em alguns casos de EHE avançada, a derivação portossistêmica intra-hepática trans jugular pode ser uma via segura para tratamento (Hudson *et al.*, 2023; Nordmann *et al.*, 2021).

## 2.5 MECANISMOS DA FIBROSE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE

A fibrose hepática na esquistossomose é uma manifestação clínica de importância, resultante de uma reação inflamatória intensa decorrente da deposição e permanência de ovos do parasita no espaço portal (Silva *et al.* 2013), sem destruição dos hepatócitos e progressão para cirrose (Abath *et al.*, 2006). É caracterizada pela deposição de colágeno e proteínas da matriz extracelular (MEC), provocando fibrose periportal e hipertensão portal pré-sinusoidal (Montesi *et al.*, 2019).

A resposta dos hepatócitos à inflamação tem papel decisivo na fisiopatologia da fibrose hepática, envolvendo o recrutamento de células pró inflamatórias, como monócitos e macrófagos e produção de citocinas e quimiocinas, que aumentam o estímulo das células hepáticas por meio da ativação de células pró-inflamatórias (Lee

*et al.*, 2015). Em estágios avançados do processo fibrótico, o fígado pode chegar a ter seis vezes mais MEC do que o fígado saudável, isso ocorre devido a mudanças quantitativas e qualitativas na composição da MEC hepática, desencadeada pela ação das células estreladas hepáticas (HSCs) (Gressner *et al.*, 2007).

As HSCs compreendem aproximadamente 15% do total de células residentes do fígado humano, são células que retêm características de fibroblastos residentes (Friedman, 2008). Esse tipo celular reside em um espaço subendotelial entre a superfície basolateral dos hepatócitos e o lado anti-luminal da camada de células endoteliais sinusoidais, chamado espaço de Disse (Heymann; Tacke, 2016). Com a injúria hepática, as HSCs quiescentes se diferenciam em uma forma ativa de miofibroblastos proliferativos e migratórios, e passam a produzir colágeno no espaço de Disse, alterando as trocas metabólicas e a capacidade funcional do fígado (Friedman, 2008), além de perder gradualmente a capacidade de armazenamento de vitamina A (D'ambrosio, 2011).

Os miofibroblastos são células semelhantes aos fibroblastos, possuem propriedades contráteis derivadas de células da linhagem mesenquimal e sua proliferação é a principal fonte de excesso de moléculas da matriz extracelular (MEC), como colágeno tipo I e III, assim como outras proteínas que substituem tecidos fibrosos (Friedman, 2008). O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), juntamente com citocinas e quimiocinas são responsáveis pela ativação de vias de sinalização celular, migração e secreção de proteínas da MEC (Friedman, 2008).

Devido ao excesso de depósito de colágeno na MEC, desencadeado pelas HSCs, estas possuem papel importante na alteração da MEC na esquistossomose. A ativação das HSCs é resultante da liberação de mediadores de células endoteliais sinusoidais, células de Kupffer, hepatócitos, plaquetas e leucócitos. Uma vez ativadas, as HSCs migram para o local da lesão e começam a se proliferar com o estímulo de moléculas como o PDGF, trombina e citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-13 e TGF- $\beta$ , secretando proteínas da MEC para produção de cicatriz (Iwaisako *et al.*, 2014; Koyama *et al.*, 2017).

Essas células também têm capacidade de secreção das metaloproteinases, enzimas importantes na regulação da fibrose. As MMPs promovem degradação da MEC e são reguladas pelos inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs),

causando um equilíbrio entre as ações de fibrogênese e degradação desta MEC (Wynn, 2007). A exposição simultânea de citocinas, incluindo IL-6, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , PDGF e TGF- $\beta$  induz altos níveis de expressão de MMP-1 (Inoue, 2017; Senties Gomez, 2005).

## 2.6 METALOPROTEINASES

Na esquistossomose, a fibrose periportal é uma manifestação clínica caracterizada pela deposição de colágeno e proteínas da matriz extracelular, resultando em fibrose (Silva *et al.* 2013). A síntese e degradação desordenada das proteínas da MEC estão envolvidas neste processo (Duarte *et al.* 2015; Shin *et al.* 2008), sendo as metaloproteínases de matriz (MMPs) o grupo de principais enzimas responsáveis por remover ou degradar o colágeno da matriz extracelular (Godoy-Santos *et al.*, 2013).

As metaloproteínases de matriz são endopeptidases dependentes de zinco (Zn<sup>2+</sup>), responsáveis por causar deterioração das proteínas da matriz extracelular, como colágeno, elastina, laminina, e auxiliam na remodelação da matriz extracelular em diversos processos fisiológicos e patológicos (Vu *et al.*, 2018). A expressão das MMPs é aumentada por fatores como citocinas (IL-6 e IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que tiveram polimorfismos (-G1082A da IL-10 e -380 do TNF-  $\alpha$ ) associados a gravidade da fibrose periportal (Silva *et al.*, 2014).

Essas proteínas são divididas em seis classes: collagenase, gelatinase, matrilisinas, estromelisinases, metaloproteínases de membrana e outros tipos de MMPs (Scannevin *et al.*, 2017). As collagenases como a MMP-1 são importantes para o processo de clivagem de colágenos intersticiais tipo I, II e III, além de clivar moléculas da MEC. As estromelisinases, como a MMP-3 também participam da clivagem de algumas moléculas da MEC, mas diferem das collagenases por não realizar clivagem de colágeno intersticial (Nagase, 2006).

Polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteínases influenciam na expressão gênica e conseqüentemente alteram sua funcionalidade, resultando em um desequilíbrio entre síntese e degradação de proteínas da MEC, podendo contribuir para gravidade da fibrose periportal (Shin *et al.* 2008; Meng *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2001). Na região promotora do gene MMP-1 foi descrita uma inserção/deleção de uma guanina (G) na posição -1607 1G/2G (Dunleavey *et al.*,

2000). Já na região promotora do gene MMP-3, na posição -1171 ocorre uma inserção/deleção de adenina 5A/6A, (5A) (Gnasso, *et al.* 2000).

As expressões de genes das MMPs e do TIMP foram avaliadas em camundongos infectados pelo *S. mansoni* com e sem tratamento com PZQ. Enquanto os camundongos tratados tiveram diminuição na expressão dessas moléculas, os não tratados tiveram a expressão aumentada de MMPs e TIMP, o que sugere que o desequilíbrio entre TIMP e MMPs podem estar associados a fibrose cumulativa (Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). A presença de polimorfismos dos genes *MMP-1* (collagenase) e *MMP-3* (stromelysin-1) já foi relatada como responsável pela variabilidade na progressão de doenças hepáticas crônicas como cirrose hepáticas, hepatite crônica e colangite esclerosante primária (Satsangi, *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2005).

A influência desses polimorfismos da região promotora dos genes das *MMP-1*(1G/2G) e *MMP-3*(6A/5A) na gravidade da FPP em pacientes com esquistossomose mansoni, precisam ser mais bem elucidados. Diante disso, faz-se necessário verificar se o polimorfismo da região promotora do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) está envolvido na gravidade da FPP em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Com estes resultados será possível disponibilizar informações futuras que auxiliem na prevenção das formas graves da esquistossomose.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre o polimorfismo da região promotora do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) e fatores sociodemográficos com a gravidade da fibrose periportal em pacientes com a forma hepatoesplênica e FPP (padrão E ou F) comparados à pacientes com a forma hepatointestinal e FPP padrão (A, B ou C).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características sociodemográficas de pacientes com esquistossomose nas formas hepatoesplênica com fibrose hepática avançada

padrão E ou F e a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A, B ou C;

- Verificar a associação entre características sociodemográficas com o padrão de FPP entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com FPP avançada padrão E ou F e pacientes com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A, B ou C
- Identificar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismo da região promotora do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com fibrose hepática avançada padrão E ou F com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A, B ou C;
- Comparar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo da região promotora do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com fibrose hepática avançada padrão E ou F com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A, B ou C;
- Verificar a associação entre o polimorfismo do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) com o padrão de FPP entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com FPP avançada padrão E ou F e pacientes com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A, B ou C.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo do tipo transversal analítico com comparação entre grupos clínicos para averiguar a associação entre os fatores genéticos (polimorfismo da metaloproteinase *MMP-3* (-1171 6A/5A) e fatores sociodemográficos com a gravidade da fibrose periportal em pacientes com esquistossomose após tratamento específico.

### 5.2 POPULAÇÃO E ÁREA DE ABRANGÊNCIA

A população do estudo foi constituída por indivíduos com esquistossomose, de ambos os sexos, com 18 anos de idade ou mais, atendidos no Ambulatório de

Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), Recife, Brasil, nos anos de 2012 e 2013.

### 5.3 AMOSTRAGEM

Foi considerado como base para o cálculo de amostra o estudo de Satsangi *et al.* (2001), que utilizaram um percentual de exposição (RFLP do gene *MMP-3* 5A - 1171) de 48% entre os controles, uma *Odds Ratio* (OR) mínima de 2,00, nível de significância de 5%, poder de 80% e uma razão entre o número de casos e controles de 1:1. Considerando uma perda estimada em 10%, assim, o estudo incluiria o **grupo 1** com 120 pacientes e o **grupo 2** com 120 pacientes.

Portanto, do biorrepositório com 342 amostras, foram selecionadas 242 pacientes com esquistossomose, divididos em 2 grupos: **grupo 1: 123** pacientes com EM forma hepatoesplênica com fibrose periportal avançada padrão E ou F pela Classificação de Niamey (Niamey *et al.* 2001) e **grupo 2: 119** pacientes com EM forma hepatointestinal com fibrose periportal leve, padrão B ou C, ou sem fibrose periportal, o padrão A (Niamey *et al.* 2001) e sem esplenomegalia. Foram excluídos 41 pacientes diagnosticados com fibrose periportal padrão D e 59 amostras foram rejeitadas devido a quantidade de DNA amostral insuficiente.

Todos os pacientes deste estudo eram provenientes de áreas endêmicas para a esquistossomose no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil e procuraram o Serviço por demanda espontânea ou foram encaminhados pelos Programas da Saúde da Família (PSF), da Zona da Mata e litoral de Pernambuco.

Para selecionar as 240 amostras biológicas, além dos critérios de elegibilidade de participantes adotados neste estudo, todas as amostras de DNA foram submetidas ao procedimento de quantificação de DNA expresso em *ng/uL*, por meio do aparelho Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite Spectrophotometer para verificar a viabilidade destas amostras para realização dos ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de Polimorfismos de Fragmentos de Restrição de Comprimento (RFLP) de acordo com Gnasso *et al.* 2000.

## 5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

**5.4.1 Critérios de inclusão:** pacientes com esquistossomose forma hepatointestinal com fibrose leve padrão B, C ou sem fibrose, padrão A, sem esplenomegalia e pacientes com a forma hepatoesplênica com fibrose periportal avançada padrão E ou F, com histórico de contato com águas contaminadas e/ou parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni*, tratamento da esquistossomose, com esplenomegalia ou história de esplenectomia prévia, com idade igual ou maior a 18 anos, de ambos os sexos.

**5.4.2 Critérios de exclusão:** pacientes com hepatopatias associadas já estabelecidas: esteatose, cirrose hepática, hepatite B ou C e doença alcoólica que foram afastadas pela história clínica, ultrassonografia de abdome e exames laboratoriais. Além disso, pacientes com outras formas clínicas de esquistossomose já diagnosticadas, pacientes submetidos à hemotransfusão nos últimos 3 meses e pacientes com FPP Padrão D também foram excluídos.

## 5.5 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

### 5.5.1 Variável dependente

Tabela 1 – Definição e categorização da variável dependente

| Variável dependente                 | Definição                                                                                                               | Categorização                                                                |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Padrão de fibrose periportal</b> | Definida por meio do padrão de fibrose hepática pela classificação de Niamey, detectado pela ultrassonografia de abdome | A - ausente<br>B – duvidosa<br>C - leve<br>E e F - avançado e muito avançado |

### 5.5.2 Variáveis Independentes

As variáveis independentes serão apresentadas abaixo: variáveis sociodemográficas (Tabela 2) cujas informações compõem banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica e Experimental”, referentes as etapas do estudo inicial realizado nos anos de 2012 e 2013 “Determinação de polimorfismos dos genes MBL,

TNF- $\alpha$  e IL-10 em portadores de esquistossomose em Pernambuco”(Silva, 2014) e o bloco de variáveis laboratoriais com as categorizações para as novas análises moleculares (Tabela 3).

Tabela 2 – Definição e categorização das variáveis sociodemográficas

| <b>BLOCO DE VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS</b> |                                                                                 |                                                                                                              |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Variáveis independentes</b>              | <b>Definição</b>                                                                | <b>Categorização</b>                                                                                         |
| <b>Idade</b>                                | Anos completos de vida no dia da entrevista, de acordo com a data de nascimento | Variável contínua e posteriormente categorizada em:<br>18 a 40 anos<br>41 anos a 60 anos<br>Acima de 60 anos |
| <b>Gênero</b>                               | Referente ao gênero masculino ou feminino                                       | Masculino<br>Feminino                                                                                        |

Tabela 3 – Definição e categorização das variáveis laboratoriais

| <b>BLOCO DE VARIÁVEIS LABORATORIAIS</b> |                                                                                                                                                                                                       |                        |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Variáveis independentes</b>          | <b>Definição</b>                                                                                                                                                                                      | <b>Categorização</b>   |
| <b>Polimorfismo do gene MMP-3</b>       | Referentes aos genótipos correspondentes a posição -1171, definidos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) Gnasso <i>et al.</i> (2000) | Genótipos*<br>5A<br>6A |

\*Esta categorização é dependente da população em que está sendo estudada

## 5.6 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

### 5.6.1 Recrutamento e acompanhamento

As etapas relacionadas a caracterização sociodemográfica, ao diagnóstico das formas clínicas da Esquistossomose, a coleta de amostras biológicas e o processamento do material biológico, já foram realizadas no período de 2012 a 2013, referentes as etapas do estudo inicial “Determinação de polimorfismos dos genes *MBL*, *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* em portadores de esquistossomose em Pernambuco”(Silva,

2014) cujos dados compõem o banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica e Experimental”. As informações sobre as variáveis sociodemográficas foram extraídas dos prontuários médicos por meio de formulário específico, após a declaração do consentimento informado pelo paciente, neste estudo anterior.

Este biorrepositório contém 342 amostras de sangue total e de DNA (padrão A: 95, B: 5, C:16, D: 98, E: 99, F: 23, e 6 amostras sem classificação de padrão) e estão armazenadas em freezer do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE-UPE), devidamente identificadas por códigos e período de armazenamento no biorrepositório de 10 anos, até junho de 2023. O Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE-UPE) e a Prof.<sup>a</sup> Paula Carolina Valença Silva (UFPE CAV) ficaram responsáveis pelos experimentos de Biologia Molecular envolvendo os polimorfismos genéticos e pela manutenção do biorrepositório no laboratório.

Para continuidade das análises moleculares para traçar o perfil imunogenético da amostragem deste estudo inicial, realizou os métodos de Biologia Molecular com categorizações genotípicas do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz durante os meses de março a dezembro de 2023.

O diagnóstico da forma clínica da doença foi realizado nos anos de 2012 e 2013, mesmo período das coletas de sangue periférico do estudo inicial (SILVA, 2014) e foi determinado por meio da história clínica do paciente e exame físico, além da avaliação por ultrassonografia do abdome superior por meio de um único operador na unidade de Endoscopia do HC/UFPE, usando um Aparelho de Siemens Acuson X150®, com um transdutor convexo de 3,5 mHz, a fim de confirmar o diagnóstico e excluir outras doenças do fígado. Os parâmetros utilizados para definir o padrão da FPP basearam-se na classificação de Niamy (Richter *et al.*, 2001): A- ausência de fibrose; B- fibrose duvidosa; C- leve; D - moderada; E – avançada; e F - muito avançada.

Foram diagnosticados como pacientes com esquistossomose hepatoesplênica aqueles pacientes que tiveram US de abdome que confirmou fibrose periportal avançada (Padrão E ou F pela Classificação de Niamy) e esplenomegalia ou história de esplenectomia prévia. Já os pacientes com esquistossomose hepatointestinal (EHI) foram aqueles pacientes que tiveram US de abdome que confirmou presença de

fibrose periportal leve (Padrão B ou C pela Classificação de Niamey) ou sem fibrose (Padrão A) e sem esplenomegalia.

#### 5.6.2 Coleta de material biológico

As amostras de sangue total periférico (10ml) que foram utilizadas na pesquisa fazem parte de um biorrepositório do estudo “Determinação de polimorfismos dos genes *MBL*, *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* em portadores de esquistossomose em Pernambuco” (Silva, 2014). Estas amostras foram coletadas no período de 2012 a 2013, utilizando tubos contendo EDTA, foram realizadas as extrações de DNA genômico, pelo método fenol clorofórmio e os soros foram armazenados em tubos secos para análises sorológicas. Após imediato armazenamento e transporte para o laboratório, os tubos secos foram centrifugados a 3000rpm durante dez minutos para separação total do soro e plasma. Após centrifugação, os soros foram armazenados em tubos eppendorf, plásticos e estéreis e armazenados a -80°C para posterior realização de dosagens séricas.

#### 5.6.3 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método fenol-clorofórmio para análise molecular adaptado de Sambrook e Russel (2001), cujas amostras compõem o biorrepositório (Silva, 2014) do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica e Experimental”, nos anos de 2012 e 2013.

#### 5.6.4 Reação em cadeia da Polimerase

Após autorização para uso de amostras biológicas do biorrepositório, o polimorfismo do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) foi determinado por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de polimorfismos de fragmentos de restrição de comprimento (RFLP) adaptado de Gnasso *et al.* 2000. Os primers utilizados para as amplificações estão dispostos na Tabela 4. A PCR foi realizada com 8,25µL do master mix Green e 1,25µL de 10 pmol de cada primer forward e reverse, 2µL de DNA amostral e a reação foi finalizada com 3,25µL de água ultrapura, livre de DNase e RNase.

O mix da PCR foi submetido a desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos para anelamento dos primers a 65°C, 1 minuto para extensão a 72°C e após a finalização dos ciclos, um período de extensão de 7 minutos a 72°C para finalização da reação. O produto da PCR foi armazenado em freezer -20°C para preservação até a etapa de digestão.

Tabela 4 – Sequências dos *primers* utilizados na análise do polimorfismo dos genes *MMP-3* de acordo com Gnasso *et al.* (2000).

| Nome do oligo nucleotídeo | Sequência                      | Referência                     |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| MMP-3<br>(forward primer) | GGTTCTCCATTCTTTGATGGGGGGAAAgA  | Gnasso <i>et al.</i><br>(2000) |
| MMP-3<br>(reverse primer) | CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT | Gnasso <i>et al.</i><br>(2000) |

#### 5.6.5 Digestão por enzima de restrição

O produto da PCR foi digerido com enzima de restrição. A reação incluiu 0,1 µL da enzima (PstI (Tth111I), 1µL do tampão, 6 µL do produto da PCR, o volume final foi ajustado com 2,9µL de água ultrapura. A reação foi mantida durante 16 horas a 37°C utilizando o termo bloco como recomendação do fabricante. O produto da reação foi separado por eletroforese em gel de agarose com concentração de 3% e visualizado com uso do brometo de etídio.

## 6 ANÁLISE DE DADOS

A análise dos dados foi realizada por meio do software Epi Info versão 7.2 (CDC, Atlanta, GA). O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas observadas, ajustadas com suas frequências esperadas, estavam de acordo com a Hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As variáveis qualitativas foram analisadas utilizando a Odds Ratio (OR) bruta com intervalos de confiança de 95% por meio de análise bivariada para verificar a associação entre os polimorfismos do gene *MMP-3* (5A>6A) e fatores sociodemográficos com padrão de FPP, considerando a forma clínica da EM como variável dependente e as variáveis selecionadas como independentes. O p valor <0.05 foi considerado como diferença estatisticamente significativa.

## **7 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS**

### **7.1 VIÉS DE INFORMAÇÃO**

1 - As informações sobre perfil sociodemográfico proveniente do banco de dados, poderiam ser interpretadas de forma equivocada, portanto para redução do viés de informação, foram adotadas as seguintes medidas:

- a) Coleta dos dados do banco de dados foi operacionalizado por um mesmo indivíduo;
- b) Padronização das medidas a serem registradas;
- c) Houve dupla entrada dos dados na tabulação destes dados que compõem o banco de dados.

2 - Erros de classificação em relação à gravidade da doença. A possibilidade de erro diagnóstico, em relação à definição da fibrose esquistossomótica pelo padrão de Niamey, foi minimizada pela avaliação ultrassonográfica do abdome superior realizada nos anos de 2012 e 2013 por um único médico operador experiente, utilizando o único aparelho Siemens Acuson X 150®, com transdutor convexo de 3,5 MegaHertz com o objetivo de confirmar o diagnóstico e afastar outras doenças hepáticas.

### **7.2 VIÉS DE CONFUNDIMENTO**

Para controlar os possíveis fatores de confusão, foram utilizadas as seguintes estratégias:

- 1. Técnica de restrição: inicialmente, houve a exclusão de pacientes com outras hepatopatias associadas: cirrose hepática, esteatose, hepatite B ou C, doença alcoólica e pacientes com diagnóstico de padrão D de FPP por ser um padrão intermediário e possivelmente confundidor.

## **8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

A presente pesquisa utilizou o banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica

e Experimental”, referentes as etapas do estudo “Determinação de polimorfismos dos genes *MBL*, *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* em portadores de esquistossomose em Pernambuco” (Silva, 2014), por meio da anuência da responsável pelo Banco de dados, por meio do Termo de autorização de uso de dados.

Este estudo refere-se a tese de Doutorado da Dra. Paula Carolina Valença Silva (Silva, 2014) aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o protocolo 113.199 e CAAE 03161512.6.0000.5208. As amostras biológicas coletadas neste estudo, estão armazenadas no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz localizado no endereço Rua Arnóbio Marques - Santo Amaro, Recife- PE, sob responsabilidade da Dra. Paula Carolina Valença Silva.

Estas amostras biológicas foram coletadas no período de 2012 a 2013, após solicitação e autorização dos participantes por meio da assinatura ou impressão datiloscópica do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi assegurada confidencialidade quanto aos resultados obtidos ou qualquer outro dado durante o período de acompanhamento. Ressaltamos que o estudo atual, que analisou o polimorfismo da região promotora do gene *MMP-3* (-1171 6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal nesta mesma amostragem de participantes, não fez uso de técnicas de Biologia Molecular que permitam a identificação dos indivíduos, mantendo o anonimato e proteção de dados destes participantes.

O intuito do uso das amostras deste biorrepositório é dar continuidade a análise do perfil imunológico e genético dessa amostragem, visto que as amostras já foram analisadas nos últimos anos, quanto suas dosagens séricas de *TNF- $\alpha$* , *IL-10*, *MBL*, o perfil de polimorfismos desses mesmos genes e outros dados clínicos e epidemiológicos. No momento da aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa para realização das coletas no ano de 2012, a atual resolução de biorrepositório RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011 provavelmente ainda estava sendo implementada, portanto os TCLE com consentimento do uso das amostras não contêm a informação de que as amostras seriam utilizadas em pesquisas futuras.

Considerando que os participantes da pesquisa em 2012 e 2013 já tinham idade avançada, que estes compõem uma amostra pulverizada em áreas endêmicas do estado de Pernambuco para esquistossomose mansoni, principalmente na microrregião da Zona da Mata, por ser um banco de dados antigo, como também, pela

possibilidade destes participantes não estarem sendo acompanhados no ambulatório especializado em esquistossomose do Hospital das Clínicas da UFPE atualmente, foi inviável uma nova solicitação de consentimento para as novas análises, por essa razão foi solicitado a dispensa de TCLE ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, cujo projeto foi aprovado mediante CAAE: 66349422.4.0000.5208.

**Justificativa para uso do Banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica e Experimental”.**

Desde o ano de 2012, o grupo de pesquisa Esquistossomose Clínica e Experimental” vem desenvolvendo estudos para traçar perfil clínico, epidemiológico e imunogenético de participantes da pesquisa intitulada “Determinação de polimorfismos dos genes *MBL*, *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* em portadores de esquistossomose em Pernambuco” (Silva, 2014).

Para dar continuidade ao estudo imunogenético destes participantes, por meio da análise do impacto dos polimorfismos da região promotora do gene *MMP-3* (6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal nestes participantes, foi necessário explorar o biorrepositório, após a anuência da responsável pelo biorrepositório, para as novas análises de Biologia Molecular.

Em torno de 340 amostras de soro, de DNA e de sangue total estão inseridas no biorrepositório devidamente identificadas por códigos e pelo período de armazenamento de 10 anos.

Todos os TCLE assinados pelos participantes, bem como, todas as informações epidemiológicas e clínicas que compõe o banco de dados, estão armazenados em computador sob responsabilidade da Professora Dra. Paula Carolina Valença Silva no Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. Além disso, este banco de dados não avaliou variáveis que possam identificar os participantes deste estudo, foi garantido o sigilo e anonimato de todos os participantes.

**Destinação das amostras ao final do período de realização da pesquisa:** Ao final do projeto as amostras serão descartadas seguindo as regras de biossegurança respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa;

**Descrição dos procedimentos de descarte e destruição das amostras:** Os procedimentos de descarte e destruição de amostras seguem o estabelecido pela RDC Nº 222/2018, da ANVISA e Ministério da Saúde. Após a realização das análises descritas no projeto, a sobra do material biológico (soro) que não puder ser recongelada será descartada junto com o seu recipiente de armazenamento (tubos eppendorf). Da mesma forma, serão descartadas as placas utilizadas para leitura. A sobra do soro será descartada diretamente na rede de esgoto (artigo 49, parágrafo 1) e os recipientes utilizados serão imersos em solução de hipoclorito a 1% para descontaminação por trinta minutos. Posteriormente, os recipientes serão descartados em saco branco leitoso com a identificação do símbolo de material com risco biológico, acrescido da expressão resíduo infectante. Posteriormente, esse material será encaminhado para disposição final ambientalmente adequada por empresa contratada pelo Laboratório.

### **Riscos e benefícios**

A perda de sigilo dos participantes é um risco que foi minimizado, visto que nenhuma das técnicas moleculares que foram utilizadas nessa pesquisa permitiram a identificação dos participantes, assim como os dados epidemiológicos utilizados, estão armazenados em um computador no endereço institucional sob responsabilidade da Profa. Paula Carolina Valença Silva. Desta forma, os dados provenientes desta pesquisa, apenas serão publicados em eventos científicos específicos, será garantido o sigilo das informações, bem como a anonimato dos participantes.

A pesquisa tem o intuito de compreender a associação de polimorfismos do gene *MMP-3* com o desenvolvimento da fibrose periportal, um acometimento grave que pode ocorrer com pacientes esquistossomóticos. Não houve benefícios direto aos participantes, uma vez que se trata de um estudo observacional, mas poderá haver benefício para a sociedade com o incremento do conhecimento científico a respeito do tema em estudo, pois deu continuidade a análise do perfil imunogenético dos participantes, já que as amostras já foram analisadas quanto suas dosagens séricas de *TNF- $\alpha$* , *IL-10*, *MBL*, o perfil de polimorfismos desses mesmos genes e outros dados clínicos e epidemiológicos. Além disso, a existência de exames de sangue que possam indicar a probabilidade de evolução de formas mais graves da esquistossomose pode contribuir para uma orientação mais eficaz, permitindo terapia

mais efetiva, com possibilidade de reduzir a morbidade, melhorar a qualidade de vida dos acometidos e retardar a progressão de manifestações clínicas mais severas.

## 9 RESULTADOS

9.1: ARTIGO 1: Influência do polimorfismo *metaloproteinase-3* (-1171 5A>6A) na fibrose periportal em pacientes com esquistossomose mansoni, Pernambuco, Brasil.

### Resumo

Na esquistossomose mansoni (EM), a fibrose periportal (FPP) surge devido a uma resposta inflamatória exacerbada provocada pela presença de ovos do parasita no espaço portal intra-hepático, culminando na deposição de colágeno e proteínas da matriz extracelular. Esta fibrose é consequência de um processo de remodelação da matriz extracelular, no qual as metaloproteinases desempenham um papel significativo. O estudo avaliou a associação entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) e fatores sociodemográficos com a FPP em indivíduos com a EM. Este é um estudo transversal analítico envolvendo 242 indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, destes 122 foram diagnosticados com forma hepatoesplênica (HE) e 119 forma hepatointestinal (HI), todos procedentes do estado de Pernambuco, Brasil. A Reação em Cadeia da Polimerase com digestão por enzima de restrição (Psyn) foi utilizada para determinação do polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A). Houve associação entre o sexo masculino e a forma HE (OR = 1,7623 IC 95% [1,0481-2,9631]; p-valor = 0,0439) bem como, indivíduos com idade acima de 41 anos, também apresentaram uma maior chance de desenvolver esta forma clínica da doença (OR= 2,8299; IC 95% [1,5211-5,2650]; p- valor= 0,0014), com maior ênfase em indivíduos acima de 61 anos (OR= 8,5541; IC 95% [3,6895-19,8326], p- valor= 0,0000). Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) entre os grupos clínicos 5A6A IC [0,7144-1,9879] p-valor 0,5882 5A5A IC [0,0912-2,9231] p-valor 0,7331 5A6A / 5A5A IC [0,6904-1,8937] p-valor 0,6949). Em conclusão, os resultados

mostraram que não houve associação entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) e o desenvolvimento de FPP. Além disso, o sexo masculino e idade acima de 41 anos foram fatores preditivos para forma HE da doença, nesta população brasileira.

**Palavras-chave:** esquistossomose mansoni; fibrose periportal; polimorfismos; metaloproteinases; *MMP-3*.

### **Abstract**

In schistosomiasis mansoni (SM), periportal fibrosis (PPF) arises due to an inflammatory response exacerbated by parasite eggs in the intrahepatic portal space, culminating in the deposition of collagen and extracellular matrix proteins. This fibrosis results from a remodeling process of the extracellular matrix, in which metalloproteinases play a significant role. The study evaluated the association between *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) (rs 3025058) and sociodemographic factors with PPF in individuals with SM. This is an analytical cross-sectional study involving 242 individuals infected with *S. mansoni*, of these 122 were diagnosed with hepatosplenic form (HS) and 119 hepatointestinal form (HI), all from the state of Pernambuco, Brazil. Polymerase chain reaction with restriction enzyme digestion (PsrI) was used to determine the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A). There was a significant association between the male gender and the HS form (OR = 1.7623 95% CI [1.0481-2.9631]; p-value = 0.0439) as well as individuals aged over 41, also had a greater chance of developing this clinical form of the disease (OR = 2.8299; 95% CI [1.5211-5.2650]; p-value = 0.0014), with greater emphasis on individuals over 61 years old (OR= 8.5541; 95% CI [3.6895-19.8326], p-value= 0.0000). There was no statistically significant association between the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) between the clinical groups (5A6A CI [0.7144-1.9879] p-value 0.5882 5A5A CI [0.0912-2.9231] p-value 0.7331 5A6A / 5A5A CI [0.6904-1.8937] p-value 0.6949). In conclusion, the results showed no association between the *MMP-3* polymorphism

(-1171 5A>6A) and the development of PPF. In addition, males, and age over 41 were predictive factors for the HE form of the disease in this Brazilian population.

**Keywords:** schistosomiasis mansoni; periportal fibrosis; polymorphisms; metalloproteinases; MMP-3.

## 1. Introdução

A esquistossomose, uma das mais antigas e prevalentes doenças parasitárias afeta aproximadamente 250 milhões de pessoas no mundo, e coloca outras 700 milhões em risco de transmissão.<sup>1</sup> No Brasil, aproximadamente 1,5 milhão de pessoas estão infectadas pelo hemoparasita *Schistosoma mansoni* principalmente na região Nordeste, com destaque para o estado de Pernambuco, pela elevada taxa de mortalidade por essa doença no país.<sup>2</sup> Apesar das estratégias de erradicação utilizadas mundialmente, a esquistossomose permanece como um problema de saúde pública.<sup>3</sup>

A principal alteração provocada pela patologia, é a formação de granuloma e consequentemente, a fibrose periportal (FPP).<sup>4</sup> Essa complicação trata-se de um processo inflamatório provocado pela estimulação do sistema imune devido a permanência dos ovos do *S. mansoni* no espaço portal, que pode provocar hipertensão portal, surgimento de varizes esofágicas e em caso de rompimento destas, hemorragia digestiva aguda.<sup>5</sup>

Devido ao seu caráter multifatorial, a progressão da FPP está associada não somente a fatores sociais e ambientais, como também fatores imunogenéticos.<sup>6</sup> A síntese e degradação desordenada das proteínas da matriz extracelular (MEC) estão envolvidas no processo de FPP,<sup>7,8</sup> que é caracterizada pela deposição de colágeno e proteínas da MEC ao longo dos ramos intra-hepáticos da veia porta.<sup>4</sup> Neste processo de degradação, o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) é fundamental para a remoção ou degradação do colágeno da MEC e eventualmente, manutenção do equilíbrio.<sup>8,9</sup>

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco ( $Zn^{2+}$ ), responsáveis por deteriorar as proteínas da MEC e auxiliar em sua remodelação em diversos processos fisiológicos e patológicos.<sup>10</sup> Dentre estas MMPs, destacam-se as estromelisinases (metaloproteinase-3-MMP3) que são responsáveis por quebrar o colágeno da membrana basal e induzir a síntese de outras metaloproteinases.<sup>11,12</sup>

O polimorfismo do gene *MMP-3* (rs 3025058), esteve associado a gravidade em doenças hepáticas. Trata-se de uma inserção/deleção de uma adenosina (A) na posição -1171, região promotora, que possui dois alelos, um tendo uma cadeia com 5 adenosinas (5A) e outro tendo uma cadeia de 6 adenosinas (6A).<sup>13</sup>

Estudos anteriores demonstraram que o polimorfismo promotor *MMP-3* (-1171 5A>6A) altera os valores séricos da MMP-3 e isso pode afetar sua habilidade de degradação da MEC.<sup>14</sup> A presença desse polimorfismo já foi associada a um pior prognóstico em outras hepatopatias como carcinoma hepatocelular, hepatite C e colangite esclerosante primária.<sup>15,16</sup>

Okamoto *et al.* (2005)<sup>16</sup> relataram que pacientes com hepatite crônica portadores do *MMP-3* (5A) obtiveram diagnóstico de cirrose hepática mais cedo em comparação com os homozigotos 6A.

Devido a participação desta metaloproteinase no processo de degradação da fibrose hepática,<sup>11,12</sup> o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) pode estar associado ao desenvolvimento de padrões mais avançados de FPP em esquistossomóticos. O impacto da expressão de variações polimórficas do gene *MMP3* e seu efeito na gravidade da FPP em indivíduos esquistossomóticos, precisa ser mais bem elucidada. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo promotor *MMP-3* (-1171 5A>6A) e fatores sociodemográficos com os padrões de fibrose periportal em pacientes com esquistossomose mansoni (EM) no estado de Pernambuco, Brasil.

## 2. Materiais e Métodos

## 2.1 População

Este é um estudo transversal analítico realizado entre os meses de março e dezembro de 2023, envolvendo 242 indivíduos com EM, divididos em dois grupos: grupo 1 com 123 indivíduos com forma hepatoesplênica (HE) com FPP (padrão E ou F) e grupo 2 com 119 indivíduos com a forma hepatointestinal, com FPP (padrão B ou C) ou sem fibrose periportal (padrão A). Para calcular o tamanho da amostra, o estudo de Satsangi et al. (2001) foi utilizado como base para os cálculos. Eles relataram uma porcentagem de exposição de 48% entre os controles, uma razão de chances mínima de 2,00, um nível de significância de 5%, um poder de 80% e uma proporção de 1:1 entre casos e controles. Considerando uma perda estimada de 10%, o estudo incluiu 120 pacientes no Grupo 1 e 120 no Grupo 2. Os dois grupos foram selecionados durante o período do estudo de acordo com os seguintes critérios: pacientes com esquistossomose hepatointestinal (HI) sem esplenomegalia e com fibrose periportal leve (padrão C) ou sem fibrose (padrão A) e pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (HE), com fibrose periportal avançada (padrão E ou F), com esplenomegalia ou histórico prévio de esplenectomia. Todos os pacientes tinham histórico de contato com água contaminada, exame de fezes positivo para *S. mansoni*, ou tratamento prévio para esquistossomose.

Todos os indivíduos foram provenientes de áreas endêmicas para doença no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, tinham idade igual ou superior a 18 anos e foram atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Brasil.

Esses indivíduos apresentaram histórico de contato com água contaminada, teste positivo para *S. mansoni* ou tratamento prévio para esquistossomose. Pacientes com hepatite B e C, esteatose, e doença alcoólica foram excluídos, assim como os submetidos a hemotransfusão nos últimos 3 meses e aqueles com outras formas clínicas de esquistossomose. Hepatite B e C foram excluídos por meio de dosagem de HBs Ag (antígeno de superfície da hepatite B), anti-

HBc (anticorpo para antígeno central da hepatite B), anti-HBs (anticorpo para antígeno de superfície da hepatite B), e anti-HCV (anticorpo para o vírus da hepatite C). Indivíduos com FPP padrão D, também foram excluídos.

O diagnóstico da forma clínica da doença foi determinado por meio da história clínica do paciente, exame físico e ultrassonografia do abdome superior por meio de um único operador na unidade de Endoscopia do HC/UFPE, usando o aparelho Siemens Acuson X150 ® para confirmar o diagnóstico e excluir outras doenças hepáticas. Os parâmetros utilizados para definir o padrão da FPP basearam-se na classificação de Níamey: A- ausência de fibrose; B- fibrose duvidosa; C- leve; D - moderada; E – avançada; e F - muito avançada.<sup>17</sup>

Foram investigadas as variáveis sociodemográficas explicativas: sexo, idade e o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A). As informações sobre as variáveis sociodemográficas foram extraídas dos prontuários médicos por meio de formulário específico, após a declaração do consentimento informado pelo paciente. A variável dependente foi a forma clínica da doença.

As amostras de DNA utilizadas foram provenientes do biorrepositório do grupo de estudo “Esquistossomose Clínica e Experimental”.

## 2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA foi extraído de sangue periférico total por meio da técnica de fenol clorofórmio para análise molecular, adaptado de Sambrook e Russel (2001)<sup>18</sup>. O polimorfismo do gene *MMP-3* (-1171 5A>6A) foi genotipado pelo método de reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de fragmentos de restrição de comprimento (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP) conforme protocolo adaptado de Gnasso *et al.* (2000).<sup>13</sup> Os primers utilizados para a determinação do gene *MMP-3* (5A>6A) foram 5’ GGTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAgA3’ e 5’ CTTCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT3’. A PCR foi realizada com 8,25µL do

master mix Green e 1,25µL de 10 pmol de cada primer forward e reverse, 2µL de DNA amostral e 3,25µL de água ultrapura, livre de DNase e RNase.

O mix da PCR foi submetido a desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos para anelamento dos primers a 65°C, 1 minuto para extensão a 72° C e após a finalização dos ciclos, um período de extensão de 7 minutos a 72°C para finalização da reação. O produto da PCR foi armazenado em freezer -20°C para preservação até a etapa de digestão.

### 2. 3 Digestão Enzimática

O produto da PCR foi digerido com enzima de restrição. A reação incluiu 0,1 µL da enzima Thermo Scientific PstI (Tth111I) 1µL do tampão, 6 µL do produto da PCR, o volume final foi ajustado com 2,9µL de água ultrapura. A reação foi mantida durante 16 horas a 37°C utilizando o termo bloco como recomendação do fabricante. Os alelos amplificados para o polimorfismo foram visualizados em gel de agarose a 3% após digestão enzimática.

### 2.4 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada por meio do software Epi Info versão 7.2 (CDC, Atlanta, GA). O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas observadas, ajustadas com suas frequências esperadas, estavam de acordo com a Hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As variáveis qualitativas foram analisadas utilizando a Odds Ratio (OR) bruta com intervalos de confiança de 95% por meio de análise bivariada para verificar a associação entre os polimorfismos do gene *MMP-3* (-1171 5A>6A) e fatores sociodemográficos com padrão de FPP. O p valor <0.05 foi considerado como diferença estatisticamente significativa.

## 3. Resultados

Um total de 242 amostras foram selecionadas do biorrepositório. Destes, 119 foram diagnosticados com forma HI (93 com padrão A de fibrose, 5 com padrão B, 21 com padrão

C), e 123 com forma HE (99 com padrão E e 24 com padrão F). Foram excluídos 41 pacientes diagnosticados com fibrose periportal padrão D e 59 amostras foram rejeitadas devido a quantidade de DNA amostral insuficiente. Os grupos clínicos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o grupo 1 (p-valor = 0,0030) e grupo 2 (p-valor = 0,0832).

Os resultados mostraram que o sexo feminino (144/242) foi predominante (59,5%) e que a média de idade foi  $48 \pm 14$  anos, com predomínio de indivíduos com faixa etária entre 41 e 60 anos em ambos os grupos clínicos (p-valor= 0,0014). Encontrou-se associação de risco estatisticamente significativa entre o sexo masculino e a forma HE (OR = 1,7623 IC 95% [1,0481-2,9631]; p-valor = 0,0439), bem como, indivíduos com idade acima de 41 anos, também apresentaram uma maior chance de desenvolver a forma HE da doença (OR= 2,8299; IC 95% [1,5211-5,2650]; p- valor= 0,0014), com maior ênfase em indivíduos acima de 61 anos (OR= 8,5541; IC 95% [3,6895-19,8326], p- valor= 0,0000) (Tabela 1).

Tabela 1: Análise bivariada da associação entre as variáveis sociodemográficas com grupos clínicos de indivíduos com esquistossomose mansoni Pernambuco, Brasil, 2023.

| Característica | Grupo HE<br>(n=123) |       | Grupo HI<br>(n=119) |       | OR     | IC 95%            | p valor |
|----------------|---------------------|-------|---------------------|-------|--------|-------------------|---------|
|                | N                   | %     | N                   | %     |        |                   |         |
| <b>Sexo</b>    |                     |       |                     |       |        |                   |         |
| Masculino      | 58                  | 47,15 | 40                  | 33,61 | 1,76   | [1,0481 – 2.9631] | 0,0439  |
| Feminino       | 65                  | 52,85 | 79                  | 66,39 |        |                   |         |
| <b>Idade</b>   |                     |       |                     |       |        |                   |         |
| 18-40 anos     | 21                  | 17,1  | 52                  | 43,7  | 1      |                   | 0,0014  |
| 41-60 anos     | 64                  | 52    | 56                  | 47,1  | 2,8299 | [1,5211-5,2650]   |         |
| ≥ 61 anos      | 38                  | 30,9  | 11                  | 9,2   | 8,5541 | [3,6895- 19.8326] |         |

Não houve evidência de associação estatisticamente significativa entre as frequências alélicas 5A e 6A *MMP-3* e as formas clínicas da doença (OR=1,0432; IC95%= [0,6935-1,5693];

p-valor= 0,9212). Também não houve evidência de associação estatisticamente significativa entre o genótipo 6A/6A, quando comparado aos genótipos 5A/6A e 5A/5A *MMP-3* entre os grupos clínicos (Tabela 2).

Tabela 2: Análise bivariada da associação entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) com grupos clínicos de indivíduos com esquistossomose mansoni Pernambuco, Brasil, 2023.

| Alelos      | HE(n=123) | HI(n=119) | OR     | IC 95%          | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|--------|-----------------|---------|
| 6A          | 182       | 178       | Ref    | NA              | 1       |
| 5A          | 64        | 60        | 1,0432 | [0,6935-1,5693] | 0,9212  |
| Genótipos   |           |           |        |                 |         |
| 6A6A        | 61        | 63        | Ref    | NA              | 1       |
| 5A6A        | 60        | 52        | 1,1917 | [0,7144-1,9879] | 0,5882  |
| 5A5A        | 2         | 4         | 0,5164 | [0,0912-2,9231] | 0,7331  |
| 5A6A / 5A5A | 62        | 56        | 1,1434 | [0,6904-1,8937] | 0,6949  |

HE: hepatoesplênico; HI: hepatointestinal; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança.

#### 4. Discussão

Este estudo investigou o impacto do polimorfismo promotor *MMP-3* (-1171 5A>6A) na gravidade da FPP esquistossomótica. Este é o primeiro estudo a analisar a influência de fatores genéticos, especificamente do gene *MMP3* na FPP em um grupo de pacientes com esquistossomose no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, uma região com alta taxa de mortalidade no país<sup>2</sup>. Foi avaliado também a associação entre sexo e idade e as formas clínicas.

Neste estudo, o predomínio do sexo feminino observado na casuística é explicado pela maior procura do sexo feminino nas unidades de saúde<sup>19</sup>. Encontrou-se que o sexo masculino e idade acima de 41 anos foram fatores de risco para a forma HE da EM, em razão da evolução da doença e do maior contato com águas contaminadas desde a infância pelo sexo masculino. Esses resultados reforçam o padrão epidemiológico observado em outros estudos, que

consideram o sexo masculino e idade avançada como fator de risco para morte por esquistossomose.<sup>20,21</sup> Adicionalmente, as complicações hepatoesplênicas como consequência granulomatosa crônica e subsequente desenvolvimento de FPP, geralmente se apresentam 5–20 anos após a infecção e podem ocorrer em menos de 10% dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.<sup>22</sup>

O polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) tem sido estudado entre diversas patologias, entre elas, doenças hepáticas.<sup>15,16</sup> Entretanto, não há relatos da associação deste polimorfismo com a FPP em indivíduos com EM. Neste estudo, observou-se grande quantidade de indivíduos com variantes polimórficas (5A5A e 5A6A) *MMP-3* distribuídos nos dois grupos clínicos, no entanto, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre *MMP-3* (-1171 5A>6A) e as formas clínicas da doença.

Similarmente, Stickel *et al.* (2008)<sup>23</sup>, avaliaram duas coortes, uma alemã com 149 pacientes cirróticos alcoólatras, 220 cirróticos alcoólatras submetidos a transplante hepático e 151 alcoólatras sem doença hepática, a outra coorte com 320 cirróticos alcoólatras e 183 alcoólatras sem doença hepática. Nesse estudo, não houve associação significativa entre as frequências alélicas 5A e 6A *MMP3* entre os grupos com cirrose ou não. Desta forma, os autores concluíram que o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) não esteve relacionado à predisposição genética a cirrose hepática em alcoólatras, nestas populações.

Em contrapartida, ElSheshtawy *et al.* (2017)<sup>24</sup> estudaram 20 pacientes com hepatite C crônica, 20 indivíduos com carcinoma hepatocelular (HCC) e 15 indivíduos saudáveis provenientes do Egito e encontraram frequência elevada do genótipo 5A/6A *MMP-3* no grupo de pacientes tanto com hepatite C crônica quanto com carcinoma hepatocelular quando comparados com o grupo saudável. Os autores concluíram que este polimorfismo pode estar associado com o risco de desenvolvimento de HCC nesta população.

Krishnaveni, D *et al.*<sup>25</sup> avaliaram o impacto do polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A/6A) em 208 pacientes com câncer gástrico e 226 indivíduos saudáveis, obtendo resultados controversos. Encontraram uma associação de risco significativa do genótipo 5A/6A com os casos de câncer gástrico em comparação com os controles, enquanto o genótipo 6A/6A foi fator de risco para desenvolvimento da doença, juntamente com a idade avançada e o alcoolismo. Os autores sugerem que é possível que, nesta população, o impacto do polimorfismo na etiologia do câncer gástrico seja leve e restrito a algum efeito do ambiente juntamente com o genótipo.

A frequência alélica 5A *MMP-3*, assim como a homozigose para esse alelo esteve significativamente elevada em indivíduos com colangite esclerosante primária (CEP) quando comparado com grupo controle em estudo que avaliou 52 pacientes com CEP e 99 indivíduos saudáveis no Reino Unido. Nesse mesmo estudo, carreadores de homozigose do genótipo 5A5A estiveram associados com hipertensão portal, que é uma manifestação clínica da esquistossomose forma HE.<sup>14</sup>

Assim, os resultados encontrados neste estudo alertam para necessidade de considerar as limitações acerca das variações étnicas comuns na população do estado de Pernambuco, assim como, da investigação de outras variações polimórficas do gene *MMP-3*, não excluindo a possibilidade de influência de polimorfismos nas regiões promotoras deste gene. Dessa forma, estudos adicionais com amostras maiores envolvendo outras populações são necessários para entender a especificidade populacional e a contribuição relativa deste polimorfismo no desenvolvimento da fibrose periportal em esquistossomóticos.

## **5. Conclusão**

Em conclusão, os resultados mostraram que não houve associação entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) e o desenvolvimento de FPP, além disso, o sexo masculino e idade acima de 41 anos foram fatores preditivos para forma HE da doença, nesta população brasileira.

## **Declaração do comitê de ética**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco por meio do CAAE: 66349422.4.0000.5208 em março de 2023.

### **Financiamento**

Esse estudo foi financiado pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

### **Declaração CRediT de contribuição dos autores**

**Thaysa Carolina Gonçalves Silva:** Conceitualização, Curadoria de dados, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Redação – rascunho original

**Paula Carolina Valença Silva:** Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Supervisão, Redação – revisão e edição

**Elker Lene da Silva:** Análise formal, Redação – revisão e edição

**Maria Tereza Cartaxo Muniz:** Recursos, Conceitualização, Curadoria de dados, Metodologia, Administração do projeto, Supervisão, Redação – revisão e edição

**Edmundo Pessoa de Almeida Lopes:** Aquisição de financiamento, Redação – revisão e edição

**Ana Lúcia Coutinho Domingues:** Conceitualização, Curadoria de dados, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Supervisão, Redação – revisão e edição

### **Declaração de interesse concorrente**

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesse financeiro ou relações pessoais que poderiam influenciar o trabalho relatado neste artigo.

### **Reconhecimento**

Os autores agradecem aos pacientes do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Pernambuco, que participaram do estudo. Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Oswaldo Cruz onde as análises foram realizadas.

### **Referências**

1. Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis: Number of People Treated in 2016 Background, n.d.) Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9249>

2. Hudson D, Cançado GGL, Afzaal T, Malhi G, Theiventhiran S, Arab JP. Schistosomiasis: Hepatosplenic Disease and Portal Hypertensive Complications. *Current Hepatology Reports*. 2023 Jun. 28;22(3):170–81. doi: doi.org/10.1007/s11901-023-00612-9
3. Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses [Internet]. [www.arca.fiocruz.br](http://www.arca.fiocruz.br). Centro de Pesquisa René Rachou; 2018. Available from: [www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662](http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662)
4. Silva PCV, Leal TV, Domingues ALC. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2013 Jul-Aug; 46 (4): 472-477. doi: doi.org/10.1590/0037-8682-0110-2013
5. Gomes, ECS, Domingues ALC, Constança SB. Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. Recife: Fiocruz Pernambuco, 2017.144 p.
6. Silva PC, Gomes AV, de Souza TK, Coêlho MR, Cahu GG, Muniz MT, Domingues AL. Association of SNP (-G1082A) IL-10 with increase in severity of periportal fibrosis in schistosomiasis, in the northeast of Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Sep; 18(9):646-52. doi: 10.1089/gtmb.2014.0098.
7. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury repair and fibrosis. *Matrix Biology*. 2015 May-July 2015; (44–46) 147-156. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.004>
8. Shin HP, Lee JI, Jung J, Sung-Vin Y, Kim HJ, Cha JM *et al.*. Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Polymorphism in Patients with HBV Related Chronic Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2008; (53): 823-829.
9. Meng C, Chen X, Li J, Wu Y, Liu H. Expression of MMP-P and TIMP-1 lesions of systemic sclerosis and its implications. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2008; (28): 480-482. doi: <https://doi.org/10.1007/s11596-008-0424-y>

10. Vu HT, Hoang TX, Kim JY. All-trans retinoic acid changes matrix-metalloproteinase 2 expression and secretion in human myeloid leukemia THP-1 cells. *BioMed Research International*. 2018 Aug. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5971080>
11. Scannevin RH, Alexander R, Haarlander TM, Burke SL, Singer M, Huo C, *et*. Discovery of a highly selective Chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation. *J Biol Chem*. 2017; (43): 17963-17974. doi: 10.1074/jbc.M117.806075.
12. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb; 15;69(3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
13. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun; 20(6):1600-5. doi: 10.1161/01.atv.20.6.1600.
14. Huang X, Han L, Huang X, Guan C, Mao X, Ye Z. Impact of 5A/6A Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-3 On Recurrent Atherosclerotic Ischemic Stroke In Chinese. *International Journal of Neuroscience*. 2016; (126): 936-941. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2015.1088013>
15. Satsangi J, Chapman RW, Haldar N, Donaldson P, Mitchell S, Simmons J, Norris S, Marshall SE, Bell JI, Jewell DP, Welsh KI. A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2001 Jul;121(1):124-30. doi: 10.1053/gast.2001.25527.
16. Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jul;20(7):1102-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03860.x.

17. Ritcher J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Sept 2001; 96 (suppl) doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000900023>
18. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
19. Albuquerque MSV, Lyra TM, Farias SF, Mendes MFM, Martelli PJJ. Acessibilidade aos serviços de saúde: uma análise a partir da Atenção Básica em Pernambuco. 2014; Saúde Debate. (38): 182-194. doi:10.5935/0103-1104.2014S014
20. Simões TC, Sena R, Meira KC. The influence of the age-period-cohort effects on the temporal trend mortality from schistosomiasis in Brazil from 1980 to 2014. Plos One. 2020; 15(4): e0231874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231874>
21. Pinheiro MCC, Ferreira AF, Silva Filho JDD, Lima MDS, Martins-Melo FR, Bezerra FSM, Sousa MS, Ramos AN Jr. Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial-temporal distribution, 2003-2018. Trop Med Int Health. 2020 Nov; 25(11):1395-1407. doi: 10.1111/tmi.13483.
22. Masi B, Perles-Barbacaru TA, Bernard M, Viola A. Clinical and preclinical imaging of hepatosplenic schistosomiasis. Trends Parasitol. 2020;36(2):206–26. doi: 10.1016/j.pt.2019.11.007
23. Stickel F, Osterreicher CH, Halangk J, Berg T, Homann N, Hellerbrand C, Patsenker E, Schneider V, Kolb A, Friess H, Schuppan D, Puhl G, Seitz HK, Leathart JL, Day CP. No role of matrix metalloproteinase-3 genetic promoter polymorphism 1171 as a risk factor for cirrhosis in alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res. 2008 Jun; 32(6):959-65. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00654.x.

24. ElSheshtawy NM, Nour MS, Hefny Z, Samir A. Gene polymorphisms of Interleukin 1 and Metalloproteinase 3 in Hepatitis C Infected Patients and Hepatocellular Carcinoma Patients. *Egypt J Immunol*. 2017 Jan;24(1):1-8.
25. Krishnaveni, D; Bhayal, AC; Shravan, KP1; Jyothy, A; Pratibha, N2; Venkateshwari, A. Heterozygosity of stromelysin-1 (rs3025058) promoter polymorphism is associated with gastric cancer. *Indian Journal of Cancer*. Apr–Jun 2015; 52(2):p 251-254. doi: 10.4103/0019-509X.175806

## 10 CONCLUSÕES

Baseado neste trabalho, em relação aos fatores genéticos e sociodemográficos para desenvolvimento de Fibrose Periportal na Esquistossomose mansônica em Pernambuco, pode-se concluir que:

- O sexo masculino e idade acima de 41 anos foram fatores preditivos para a forma HE, com maior ênfase em indivíduos acima de 61 anos.
- Não houve evidência de associação entre as frequências alélicas 5A e 6A *MMP-3* e as formas clínicas da esquistossomose
- Não houve evidência de associação entre os genótipos (6A/6A, 5A/6A e 5A/5A) *MMP-3* quando comparados com as formas clínicas.

## 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa do grupo de pesquisa “Esquistossomose Clínica e Experimental” que desde 2012 vem desenvolvendo estudos com o objetivo de traçar perfil clínico, epidemiológico e imunogenético de participantes da pesquisa intitulada “Determinação de polimorfismos dos genes *MBL*, *TNF-α* e *IL-10* em portadores de esquistossomose em Pernambuco” (Silva, 2014).

Esse estudo não encontrou associação entre o polimorfismo *MMP-3* (-1171 5A>6A) e o desenvolvimento de FPP, entretanto, há a necessidade de considerar as

limitações em razão da existência de outras variações polimórficas da MMP-3 e das variações étnicas existentes na população do estado de Pernambuco. Dessa forma, sugere-se que outros estudos sejam realizados para melhor compreensão do impacto deste polimorfismo e de outras metaloproteinases na gravidade da fibrose periportal de paciente com esquistossomose, pois estas têm papel importante no processo de síntese e degradação da MEC. Assim, o grupo de pesquisa já tem estudos em desenvolvimento com o polimorfismo 1G/2G *MMP-1* (metaloproteinase 1) nesta mesma amostra de pacientes, a fim de prosseguir traçando o perfil clínico, epidemiológico e imunogenético.

Em razão da expiração do prazo de validade do biorrepositório utilizado neste estudo, o grupo de estudo planeja a construção de um novo biorrepositório, com amostras de sangue total, DNA e soro de pacientes com esquistossomose mansoni, que permita novas análises com outros marcadores genéticos (1306C/T) *MMP2*, (C-1562T) *MMP9*, (-418G) *TIMP-2* e (509C/T) *TFGβ1* e suas respectivas dosagens séricas, além de uma nova investigação de dados clínicos e epidemiológicos que permita a atualização do quadro atual da esquistossomose no estado de Pernambuco.

A seguir as perspectivas deste estudo:

- 1- Realizar genotipagens do gene *MMP-1* através da tecnologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de Polimorfismos de Fragmentos de Restrição de Comprimento (RFLP) de acordo com Dunleavey (2000).
- 2- Pretende-se fazer um seguimento dos grupos com e sem polimorfismos dos genes *MMP-3* e *MMP-1*, a fim de observar se há relação destes polimorfismos com a diminuição da FPP após o tratamento específico.
- 3- Realizar genotipagens dos genes (1306C/T) *MMP2*, (C-1562T) *MMP9*, (-418G) *TIMP-2* e (509C/T) *TFGβ1* para dar continuidade ao estudo imunogenético destes participantes.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learned from human studies? **Trends Parasitol.** 2006, v. 22, n. 2, p. 85-91. Disponível em: [10.1016/j.pt.2005.12.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.12.004). Acesso em: janeiro de 2024.
- BARBOSA, VS. *et al.* Modelling of the distribution of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, Brazil. **Geospatial Health.** 2016, v. 11, n. 490, p. 362-367. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/gh.2016.490>. Acesso em: janeiro de 2024
- BARBOSA, C. *et al.* Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil. **Rev. Ambient. Água.** 2018. v. 13, n. 3, p. 1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2151>. Acesso em: dezembro de 2023
- BARRETO M., GOMES E., BARBOSA C. High-risk tourism in areas vulnerable to schistosomiasis mansoni transmission in Brazil. **Cad Saúde Pública.** 2016, v. 32, n.3, p. 1-15. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00190815>. dezembro de 2023
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 30.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) – Coordenadoria do Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções Controle da Esquistossomose do Estado de São Paulo/PCE-SP, Brasília: Ministério da Saúde, 2007 (Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas.** Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- CAI, P. *et al.* Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis japonica: Lessons learnt from a setting of low infection intensity. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 2019, v. 13, n. 3, p. 1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007228>. Acesso em: dezembro de 2023.

CARVALHO, L. *et al.* Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae). **Experimental Parasitology**. 2015, v.159, p. 207-214.

COLLEY, D. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**. 2014, p. 1-17. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2) > Acesso em: novembro de 2023.

CIOLI, D. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever?. **Molecular & Biochemical Parasitology**. 2014, v.195, n.1, p. 23-29.

CHEN, M. Assessment of morbidity due to *Schistosoma japonicum* infection in China. **Infect. Dis. Poverty**. v. 3, n. 6, 2014. Disponível em: 10.1186/2049-9957-3-6. Acesso em: dezembro de 2023

D'AMBROSIO, D. *et al.* Distinct Populations of Hepatic Stellate Cells in the Mouse Liver Have Different Capacities for Retinoid and Lipid Storage. **PLoS One**. 2011, v. 6, n. 9, 2011. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0024993. Acesso em: outubro, 2023.

DUARTE.S, BABER.J, FUJII.T, *et al.* Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. **Elsevier journal**. 2015, v.44, n.46, p.147-156. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/journal/0945053X>. Acesso: outubro, 2022.

DUNLEAVEY L, BEYYZADE L, YE S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. **Matrix Biol**, 19, p: 175-1, 2000.

FARIAS, B.V., 2013. Avaliação Do Equilíbrio de Adsorção e Projeto de Condições de Separação de Praziquantel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 91 f. Dissertação - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

MENG, C. *et al.* Expression of MMP-9 and TIMP-1 in Lesions of Systemic Sclerosis and Its Implications. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**. 2008, v. 28, n. 4, p.480-482. Disponível em: doi: 10.1007/s11596-008-0424-y. Acesso em: novembro de 2023.

SILVA FILHO, J. *et al.* Detection of schistosomiasis in an area directly affected by the São Francisco river large-scale water transposition project in the northeast of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2017, v.50, n.5, p. 658-65.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology**. 2008, v.134, p. 1655-69. Disponível em: 10.1053/j.gastro.2008.03.003. Acesso em: outubro, 2022.

GODOY-SANTOS, A *et al.* MMP-1 Promoter Polymorphism Is Associated With Primary Tendinopathy of the Posterior Tibial Tendon. **J Orthop Res**. Jul, 2013, v. 31, n. 7, p. 1103-7. Disponível em: doi: 10.1002/jor.22321. Acesso em: setembro, 2023.

GOMES, E. *et al.* Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco - Brazil. **Int J Health Geogr**. 2012, v. 11, n.51, p. 1-11. Disponível em: doi:10.1186/1476-072X-11-51. Acesso: maio, 2022.

GOMES, E *et al.* Urban transmission of schistosomiasis: new epidemiological situation in the forest area of Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Oct-Dec 2016, v.19, n. 4, p. 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600040012>. Acesso em: julho, 2022.

GOMES, E *et al.* Urban schistosomiasis: An ecological study describing a new challenge to the control of this neglected tropical disease. **The Lancet Regional Health – Americas**, 2022, v. 8, n.100144. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100144>> Acesso em: Abril, 2022

GNASSO, A *et al.* Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb. Vas.Biol*, 2000, v. 20, n. 6. Disponível em: doi: 10.1161/01.atv.20.6.1600. Acesso em: setembro, 2022.

GRESSNER, O. V.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunctiontests. **Clin. Chim. Acta**. 2007, v. 381, p. 107-113. Disponível em: doi: 10.1016/j.cca.2007.02.038. Acesso em: novembro de 2023.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am**. 2012, v. 22, p. 383-97. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.004>. Acesso: outubro, 2022.

HEYMANN, F, TACKE, F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. Jan, 2016, v. 13, n. 2, p. 88-1102016. Disponível em: doi: 10.1038/nrgastro.2015.200. Acesso em: novembro de 2023.

INOUE, A. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic

stellate cells. **Cytotechnology**. Jun, 2017, v. 69, n. 3, p: 461-468. Disponível em: doi: 10.1007/s10616-016-9948-3. Acesso em: novembro de 2023.

IWAISAKO, K. *et al.* Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. **Proc. Natl Acad. Sci.** 2014, v. 111, n.32, p: 297-305. Disponível em: doi: 10.1073/pnas.1400062111. Acesso em: novembro de 2023.

JOHNSON,R.W *et al.* Lack of association of a functionally relevant single nucleotide polymorphism of matrix metalloproteinase-1 promoter with systemic sclerosis (scleroderma).**Genes and Immunity**. 2001, v. 2, p. 273-275, 2001. Disponível em: 10.1038/sj.gene.6363768. Acesso em: janeiro, 2024

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou. 22ed., 79p. 2018.

KOYAMA, Y. *et al.* Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis. **J. Clin. Invest.** 2017, v.127, p. 1254–1270. Disponível: 10.1172/JCI88845. Acesso em: fevereiro, 2024.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Esquistossomose mansônica. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p: 931-946, 2005.

LEITE, L *et al.* Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and advanced periportal fibrosis. **PLoS Negl Trop Dis**. Jul, 2013, v. 18, n. 7, p. e2314. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pntd.0002314. Acesso em: outubro, 2023.

LEITE L *et al.* Relationship between splenomegaly and hematologic findings in patients with hepatosplenic schistosomiasis. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2013, v. 35, p. 332–336. Disponível em: doi: 10.5581/1516-8484.20130098. Acesso em: novembro de 2023.

LOVERDE, Philip T. Schistosomiasis. **Fried Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology** 1154, Springer, Cham. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_3). Acesso em: setembro, 2023.

LOYO, Rodrigo; BARBOSA, Constança. Bio-indicators for the evaluation of potential risk of schistosomiasis transmission at the Apipucos reservoir, Pernambuco State.

**Rev. Ambient. Água.** 2016, v.11, n.1. Disponível em: <https://doi.org/10.4136/ambi-aqua.1756>. Acesso em: novembro de 2023.

MAHMOUD, A.A.F. Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. **Harrison Medicina Interna**, 17<sup>a</sup> ed, 1, p: 1330-1336, 2008.

MC MANUS, D. *et al.* Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**. 2018, v. 9, n. 1, p. 13. Disponível em: doi: 10.1038/s41572-018-0013-8. Acesso em: Janeiro, 2024

MEDEIROS, T. *et al.* Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with schistosomiasis mansoni. **Arq. Gastroenterol**. Jan-Mar 2014, v. 51, n. 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-28032014000100008>. Acesso em: outubro, 2023

MEISTER, I. *et al.* Development and validation of an enantioselective LC–MS/MS method for the analysis of the anthelmintic drug praziquantel and its main metabolite in human plasma, blood and dried blood spots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2016, v.1, n. 118, p. 81-85.

MELO, A.L.; COELHO, P. M. Z. IN: NEVES, D. P. Schistosoma mansoni e a doença. **Parasitologia Humana**, 2010, p.193-212.

MELO, C *et al.* Schistosomiasis mansoni in families of fishing workers of endemic area of Alagoas. **Esc Anna Nery**, 23, 1, p:1-10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2177-9465-EAN-2018-0150> . Acesso em: fevereiro, 2024

MONTESI, S. *et al.* Molecular imaging of fibrosis: recent advances and future directions. **The Journal of Clinical Investigation**. 2019, v. 129, n. 1, p. 24-33. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI122132>. Acesso em: fevereiro, 2024

MORAES, J., 2012. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current Topics in Tropical Medicine**. 2012, p. 333-358.

NACIFE, M. *et al.* Prevalence of schistosomiasis mansoni in indigenous Maxakali villages, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, 2018, v. 60, n.1 p.1-7.

NAGASE H., VISSE, R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, **Cardiovasc. Res**. 2006, v.15, n. 69, p. 562-73,. Disponível em: doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002. Acesso em: fevereiro, 2024

NORDMANN T. *et al.* TIPS and splenorenal shunt for complications of portal hypertension in chronic hepatosplenic schistosomiasis—A case series and review of the literature. **PLoS Negl Trop Dis**. 2021, v. 15, n. 12, p. 1-15 ,2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010065>. Acesso em: fevereiro, 2024

OKAMOTO, K.; MIMURA, K.; MURAWAKI, *et al.* Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**. 2005, v. 20, n.7, p. 1102-1108.

OLIVEIRA, E.,*et al.* Investigation of schistosomiasis cases and deaths in the city of Recife, Pernambuco, Brazil, 2005-2013. **Epidemiol Serv Saude**. 2018, v. 27, n. 4, p.1-11.

OLIVEIRA, R. *et al.* Atividade anti-helmíntico in vitro e in vivo de *Baccharis trimera* (Less) DC contra vermes imaturos e Adultos de *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. 2014, v. 139, p. 63-72.

PEREIRA, LF, *et al.* Clinical and laboratory evaluation of schistosomiasis mansoni patients in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2010, v.105, p.449-453. Disponível: [10.1590/S0074-02762010000400016](https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400016). Acesso em: fevereiro, 2024

PRATA, A. *et al.* Comparison between clinical and ultrasonographic findings in cases of periportal fibrosis in an endemic area for schistosomiasis mansoni in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2010, v.43, p. 129-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200005>. Acesso em: fevereiro, 2024

RICHTER, J. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2001, v. 96, p.151-156.

SALVANA, E. e KING, C. Schistosomiasis in travelers and immigrants. **Curr. Infect. Dis. Rep**. 2008, v.10, p. 42–49. Disponível em: [doi: 10.1007/s11908-008-0009-8](https://doi.org/10.1007/s11908-008-0009-8). Acesso em: fevereiro, 2024

SANTOS, F.K., 2011. Desenvolvimento e Caracterização de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo Praziquantel. 83 f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SATSANGI, J. *et al.* A Functional Polymorphism of the Stromelysin Gene (MMP-3) Influences Susceptibility to Primary Sclerosing Cholangitis. **Gastroenterology**. 2001, v.121, p.121-124. Disponível em: doi: 10.1053/gast.2001.25527 Acesso em: fevereiro, 2024

SCANNEVIN, R. Discovery of a highly selective chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation, **J. Biol. Chem.** 2017, v. 292, n.43, p.17963-17974. Disponível em: doi:10.1074/jbc.M117.806075. Acesso em: fevereiro, 2024

SENTIES-GOMEZ, M. *et al.* Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta. **Gac Med Mex.** 2005, v.141, p. 315–322.

SHIN, H. *et al.* Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Polymorphism in Patients with HBV Related Chronic Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**. 2008, v. 53, p. 823-829.

SILVA, P.C.V; LEAL, T.V; DOMINGUES, A.L.C. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013, v. 46, n. 4, p. 472-477. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0110-2013>. Acesso em: fevereiro, 2024.

SILVA, P. *et al.* Association of SNP (-G1082A) IL-10 with Increase in Severity of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis, in the Northeast of Brazil. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**. 2014, v. 18, n. 9, p. 646–652. Disponível em: doi: 10.1089/gtmb.2014.0098. Acesso em: fevereiro, 2024.

SILVA, Paula. Polimorfismos de base única dos genes TNF- $\alpha$  e IL-10 e outros fatores de risco para fibrose periportal em pacientes com esquistossomose mansônica. 2014. p. 1-230. Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, P. *et al.* Influence of a TNF- $\alpha$  Polymorphism on the Severity of Schistosomiasis Periportal Fibrosis in the Northeast of Brazil **Genet Test Mol Biomarkers**. 2017, v. 21,

n.11, p. 658-662. Disponível em: doi: 10.1089/gtmb.2017.0133. Acesso em: janeiro, 2024

SILVA, L. *et al.* Schistosomiasis mansoni in the northeast region of Brazil: Temporal modeling of positivity, hospitalization, and mortality rates. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2018, v.52, p.1-6201. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0458-2018>. Acesso em: outubro, 2023.

SILVA, B *et al.* High schistosomiasis-related mortality in Northeast Brazil: trends and spatial patterns. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.** 2022, v.55. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0431-2021>> Acesso em: 1 de outubro, 2023.

SINGH, K. P. H. C. GERARD, A. P. HUDSON, *et al.* Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by Schistosoma mansoni eggs **Department of Immunology and Microbiology.** 2004, v. 98, n. 6, p. 581-93. Disponível: doi: 10.1179/000349804225021316. Acesso em: fevereiro, 2024

SINGH, K *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. **Immunology.** 2004, p.343:352. Disponível em: doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01817.x. Acesso em: fevereiro, 2024

SOUZA, F. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med.** 2011, v. 9, n. 4, p. 300-7.

UTZINGER, J., *et al.* New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** 2015, v. 21, n. 6, p. 529–542. Disponível em: 10.1016/j.cmi.2015.03.014. Acesso em: fevereiro, 2024

VOIETA, I *et al.* Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. **Mem Inst**

**Oswaldo Cruz.** 2010, v.105, p. 414-21. Disponível em: doi:10.1590/S0074-02762010000400011. Acesso em: fevereiro, 2024

VU, H., HOANG, T. KIM J.Y., All-trans retinoic acid enhances matrix metalloproteinase 2 expression and secretion in human myeloid leukemia THP-1 cells, **BioMed Res. Int.**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/5971080>. Acesso em: fevereiro, 2024

YA, L. WALLACE, M, FRIEDMAN, S. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Gut.** 2015, v.64, p. 830-41. Disponível em: 10.1136/gutjnl-2014-306842. Acesso em: fevereiro, 2024

WEERAKOON, K. G. A. D., *et al.* Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews.** 2015, v. 28, n. 4, p. 939–967. Disponível em: doi: 10.1128/CMR.00137-14. Acesso em: fevereiro, 2024

WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2016. **The Weekly Epidemiological Record.** 2018, v. 91, n. 5, p. 53-60. Acesso em: fevereiro, 2024

WILSON, S. *et al.*. Health implications of chronic hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children chronically exposed to malarial infections and *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2010, v. 104, n. 110–116.

WYNN, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **Journal of Clinical Investigation.** 2007, v. 117, n. 3, p. 524-29.

**APÊNDICE A – Versão em língua inglesa do artigo 01 submetido à Revista Acta Tropica**

**Influence of *metalloproteinase-3* (-1171 5A>6A) polymorphism on periportal fibrosis in patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil.**

Thaysa Carolina Gonçalves Silva<sup>a</sup>, Paula Carolina Valença Silva<sup>b</sup>, Elker Lene Santos de Lima<sup>c,d</sup>, Maria Tereza Cartaxo Muniz<sup>d</sup>, Edmundo Pessoa Lopes<sup>e</sup>, Ana Lúcia Coutinho Domingues<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Pernambuco – Recife Campus – UFPE, Cidade Universitária, Av. Professor Moraes Rego, 1235, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

<sup>b</sup>Federal University of Pernambuco – Academic Center of Vitoria – UFPE/CAV, R. Alto do Reservatório – Alto José Leal, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Molecular Biology, Hospital Universitario Oswaldo Cruz, University of Pernambuco, Recife, Brazil,

<sup>d</sup>Postgraduate Program in Applied Cell and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>e</sup>Gastroenterology Department, Clinical Hospital/EBSERH- Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

**Corresponding Author:** Thaysa Carolina Gonçalves Silva

Email: [thaysa.goncalves@ufpe.br](mailto:thaysa.goncalves@ufpe.br)

**Abstract**

In schistosomiasis mansoni (SM), periportal fibrosis (PPF) arises due to an inflammatory response exacerbated by parasite eggs in the intrahepatic portal space, culminating in the deposition of collagen and extracellular matrix proteins. This fibrosis results from a remodeling process of the extracellular matrix, in which metalloproteinases play a significant role. The study evaluated the association between *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) (rs 3025058) and sociodemographic factors with PPF in individuals with SM. This is an analytical cross-sectional study involving 242 individuals infected with *S. mansoni*, of these 122 were diagnosed with hepatosplenic form (HS) and 119 hepatointestinal form (HI), all from the state of Pernambuco, Brazil. Polymerase chain reaction with restriction enzyme digestion (PstI) was used to determine the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A). There was a significant association between the male gender and the HS form (OR = 1.7623 95% CI [1.0481-2.9631];

p-value = 0.0439) as well as individuals aged over 41, also had a greater chance of developing this clinical form of the disease (OR = 2.8299; 95% CI [1.5211-5.2650]; p-value = 0.0014), with greater emphasis on individuals over 61 years old (OR= 8.5541; 95% CI [3.6895-19.8326], p-value= 0.0000). There was no statistically significant association between the MMP-3 polymorphism (-1171 5A>6A) between the clinical groups (5A6A CI [0.7144-1.9879] p-value 0.5882 5A5A CI [0.0912-2.9231] p-value 0.7331 5A6A / 5A5A CI [0.6904-1.8937] p-value 0.6949). In conclusion, the results showed no association between the MMP-3 polymorphism (-1171 5A>6A) and the development of PPF. In addition, males, and age over 41 were predictive factors for the HS form of the disease in this Brazilian population.

**Keywords:** schistosomiasis mansoni; periportal fibrosis; polymorphisms; metalloproteinases; MMP-3.

## 6. Introduction

Schistosomiasis, one of the oldest and most prevalent parasitic diseases affects approximately 250 million people worldwide and puts another 700 million at risk of transmission.<sup>1</sup> In Brazil, approximately 1.5 million people are infected by the hemoparasite *Schistosoma mansoni*, mainly in the Northeast region, with emphasis on the state of Pernambuco, due to the high mortality rate due to this disease in the country.<sup>2</sup> Despite the eradication strategies used worldwide, Schistosomiasis remains a public health problem.<sup>3</sup>

The main change caused by pathology is the formation of granuloma and consequently periportal fibrosis (PPF).<sup>4</sup> This complication is an inflammatory process caused by stimulation of the immune system due to the permanence of *S. mansoni* eggs in the portal space, which can cause portal hypertension, emergence of esophageal varices, and in case of rupture of these acute digestive bleeding.<sup>5</sup>

Due to its multifactorial character, the progression of PPF is associated not only with social and environmental factors, but also immunogenetic factors.<sup>6</sup> The synthesis and disorderly degradation of extracellular matrix proteins (ECM) are involved in the PPF process,<sup>7,8</sup> which is characterized by the deposition of collagen and ECM proteins along the intrahepatic branches of the portal vein.<sup>4</sup> In this degradation process, the role of matrix metalloproteinases (MMPs) is critical for the removal or degradation of ECM collagen and eventually maintenance of the balance.<sup>8,9</sup>

MMPs are zinc-dependent endopeptidases (Zn<sup>2+</sup>), responsible for deteriorating ECM proteins and assisting in their remodeling in several physiological and pathological processes.<sup>10</sup> Among these MMPs, stromelysin (metalloproteinase-3-MMP3) stands out which is responsible

for breaking the collagen of the basement membrane and inducing the synthesis of other metalloproteinases.<sup>11,12</sup>

The polymorphism of the *MMP-3* (rs 3025058) gene was associated with the severity of liver diseases. It is an insertion/deletion of an adenosine (A) at position -1171, promoter region, which has two alleles, one having a chain with 5 adenosines (5A) and another having a chain of 6 adenosines (6A).<sup>13</sup>

Previous studies have shown that the promoter polymorphism *MMP-3* (-1171 5A>6A) changes the serum values of MMP-3, and this may affect its ability to degrade ECM.<sup>14</sup> The presence of this polymorphism has already been associated with a worse prognosis in other hepatopathies such as hepatocellular carcinoma, hepatitis C, and primary sclerosing cholangitis.<sup>15,16</sup>

Okamoto et al (2005)<sup>16</sup> reported that patients with chronic hepatitis with *MMP-3* (5A) were diagnosed with liver cirrhosis earlier compared to homozygotes 6A.

Due to the participation of this metalloproteinase in the degradation process of hepatic fibrosis,<sup>11,12</sup> the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) may be associated with the development of more advanced patterns of PPF in schistosomiasis. The impact of the expression of polymorphic variations of the *MMP3* gene and its effect on the severity of PPF in schistosomiasis individuals needs to be better elucidated. Therefore, this study aimed to evaluate the association between the promoter polymorphism *MMP-3* (-1171 5A>6A) and sociodemographic factors with periportal fibrosis patterns in patients with schistosomiasis mansoni (SM) in the state of Pernambuco, Brazil.

## 7. Materials and Methods

### 2.1 Population

This is an analytical cross-sectional study conducted between March and December 2023, involving 242 individuals with SM, divided into two groups: Group 1 with 123 individuals with hepatosplenic form (HS) with PPF (standard E or F) and Group 2 with 119 individuals with hepatointestinal form, with PPF (standard B or C) or without periportal fibrosis (standard A). To calculate the sample size, the study by Satsangi et al. (2001) was used as the basis for sample size calculations. They reported an exposure percentage of 48% among the controls, a minimum odds ratio of 2.00, a significance level of 5%, a power of 80% and a 1:1 ratio between cases and controls. Considering an estimated loss of 10%, the study included 120 patients in Group 1 and 120 in Group 2.

The two groups were selected during the study period according to the following criteria: patients with HI schistosomiasis without splenomegaly and with mild periportal

fibrosis (pattern C from Niamey's classification) or those with no fibrosis (pattern A) and patients with HS schistosomiasis with advanced periportal fibrosis (pattern E or F from Niamey's classification) with splenomegaly or previous history of splenectomy. All of these patients had a history of contact with contaminated water, a positive stool test for *S. mansoni*, or prior treatment for schistosomiasis.

All individuals were from endemic areas for disease in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, were 18 years old or older, and were treated at the Gastroenterology Outpatient Clinic of the Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), Brazil.

These individuals had a history of contact with contaminated water, a positive test for *S. mansoni*, or previous treatment for schistosomiasis. Patients with hepatitis B and C, steatosis, and alcohol disease were excluded, as well as those undergoing blood transfusion in the last 3 months and those with other clinical forms of schistosomiasis. Hepatitis B and C were excluded by dosing HBs Ag (hepatitis B surface antigen), anti-HBc (antibody for hepatitis B central antigen), anti-HBs (antibody for hepatitis B surface antigen), and anti-HCV (antibody for hepatitis C virus). Individuals with PPF pattern D were also excluded.

The diagnosis of the clinical form of the disease was determined through the patient's clinical history, physical examination, and ultrasound of the upper abdomen using a single operator in the HC/UFPE endoscopy unit, using the Siemens Acuson X150<sup>®</sup> appliance to confirm the diagnosis and exclude other liver diseases. The parameters used to define the PPF standard were based on the Niamey classification: A- absence of fibrosis; B- doubtful fibrosis; C- mild; D - moderate; E - advanced; and F - very advanced.<sup>17</sup>

The following explanatory sociodemographic variables were investigated: gender, age, and *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A). Information on sociodemographic variables was extracted from medical records through a specific form, after the declaration of informed consent by the patient. The dependent variable was the clinical form of the disease.

The DNA samples used were from the biorepository of the study group "Clinical and Experimental Schistosomiasis".

## 2.2 Polymerase Chain Reaction

DNA was extracted from total peripheral blood using the chloroform phenol technique for molecular analysis, adapted from Sambrook and Russel (2001)<sup>18</sup>. The polymorphism of the *MMP-3* gene (-1171 5A>6A) was genotyped by the polymerase-polymorphism chain reaction method of length restriction fragments (Polymerase chain Reaction-Restriction Fragment length polymorphism - PCR-RFLP) according to a protocol adapted from Gnasso et al (2000).<sup>13</sup>

The primers used for the determination of the *MMP-3* gene (5A>6A) were 5' GGTTCATCTTTTGGGGGAAAgA3' and 5' CTCCTCTGGAATTCACATTGCCACT3'. PCR was performed with 8.25µL of the expert mix Green and 1.25µL of 10 pmol of each primer forward and reverse, 2µL of sample DNA, and 3.25µL of ultrapure water, free of DNase and RNase.

The PCR mix was denatured for 5 minutes at 95°C, followed by 35 denaturation cycles for 30 seconds at 94°C, 30 seconds for annealing the primers at 65°C, 1 minute for extension at 72°C and after completion of the cycles, an extension period of 7 minutes at 72°C to complete the reaction. The PCR product was stored in a freezer at -20°C for preservation until the digestion stage.

### 2. 3 Enzymatic Digestion

The PCR product was digested with restriction enzyme. The reaction included 0.1 µl of the Thermo Scientific *PsyI* enzyme (Tth111I) 1µL of the buffer, 6 µl of the PCR product, and the final volume was adjusted with 2.9µL of ultrapure water. The reaction was maintained for 16 hours at 37°C using the term block as the manufacturer's recommendation. The amplified alleles for polymorphism were visualized in 3% agarose gel after enzymatic digestion.

### 2.4 Statistical analysis

Data analysis was performed using the software Epi Info version 7.2 (CDC, Atlanta, GA). The chi-square test ( $\chi^2$ ) was used to verify if the observed genotypic frequencies, adjusted with their expected frequencies, were by the Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis. The qualitative variables were analyzed using the crude Odds Ratio (OR) with 95% confidence intervals through bivariate analysis to verify the association between *MMP-3* gene polymorphisms (-1171 5A>6A) and sociodemographic factors with PPF pattern. The p-value <0.05 was considered as a statistically significant difference.

## 8. Result

A total of 242 samples were selected from the biorepository. Of these, 119 were diagnosed with HI form (93 with standard A of fibrosis, 5 with standard B, 21 with standard C), and 123 with HS form (99 with standard E and 24 with standard F). We excluded 41 patients diagnosed with standard periportal fibrosis D and 59 samples were rejected due to insufficient sample DNA. The clinical groups are not in Hardy-Weinberg equilibrium, Group 1 (p-value = 0.0030) and Group 2 (p-value = 0.0832).

The results showed that females (144/242) were predominant (59.5%) and that the mean age was  $48 \pm 14$ , with a predominance of individuals aged between 41 and 60 in both clinical groups (p-value = 0.0014). A statistically significant association was found between the male

gender and the HS form (OR = 1.7623, 95% CI [1.0481-2.9631], p-value = 0.0439), as well as individuals aged over 41, also presented a greater chance of developing the HS form of the disease (OR = 2.8299; 95% CI [1.5211-5.2650]; p-value = 0.0014), with greater emphasis on individuals over 61 (OR = 8.5541; 95% CI [3.6895-19.8326], p-value = 0.0000) (Table 1).

Table 1: Bivariate analysis of the association between sociodemographic variables and clinical groups of individuals with schistosomiasis mansoni Pernambuco, Brazil, 2023.

| Characteristic | HS Group |       | HI Group |       | OR     | 95%CI             | p-value |
|----------------|----------|-------|----------|-------|--------|-------------------|---------|
|                | (n=123)  |       | (n=119)  |       |        |                   |         |
|                | N        | %     | N        | %     |        |                   |         |
| <b>Gender</b>  |          |       |          |       |        |                   |         |
| Masculine      | 58       | 47.15 | 40       | 33.61 | 1.76   | [1.0481-2.9631]   | 0.0439  |
| Feminine       | 65       | 52.85 | 79       | 66.39 |        |                   |         |
| <b>Age</b>     |          |       |          |       |        |                   |         |
| 18-40 years    | 21       | 17.1  | 52       | 43.7  | 1      |                   | 0.0014  |
| 41-60 years    | 64       | 52    | 56       | 47.1  | 2.8299 | [1.5211-5.2650]   |         |
| ≥ 61 years     | 38       | 30.9  | 11       | 9.2   | 8.5541 | [3.6895- 19.8326] |         |

There was no evidence of a statistically significant association between allelic frequencies 5A and 6A *MMP-3* and the clinical forms of the disease (OR=1.0432; 95%CI= [0.6935-1.5693]; p-value= 0.9212). There was also no evidence of a statistically significant association between genotype 6A/6A when compared to genotypes 5A/6A and 5A/5A *MMP-3* between clinical groups (Table 2).

Table 2: Bivariate analysis of the association between *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) with clinical groups of individuals with schistosomiasis mansoni Pernambuco, Brazil, 2023.

| Alleles          | HS(n=123) | HI(n=119) | OR     | 95% CI          | p-value |
|------------------|-----------|-----------|--------|-----------------|---------|
| 6A               | 182       | 178       | Ref    | NA              | 1       |
| 5A               | 64        | 60        | 1.0432 | [0.6935-1.5693] | 0.9212  |
| <b>Genotypes</b> |           |           |        |                 |         |
| 6A6A             | 61        | 63        | Ref    | NA              | 1       |
| 5A6A             | 60        | 52        | 1.1917 | [0.7144-1.9879] | 0.5882  |

|             |    |    |        |                 |        |
|-------------|----|----|--------|-----------------|--------|
| 5A5A        | 2  | 4  | 0.5164 | [0.0912-2.9231] | 0.7331 |
| 5A6A / 5A5A | 62 | 56 | 1.1434 | [0.6904-1.8937] | 0.6949 |

HS: hepatosplenic; HI: hepatointestinal; OR: Odds Ratio; CI: confidence interval.

## Discussion

This study investigated the impact of *MMP-3* promoter polymorphism (-1171 5A>6A) on the severity of schistosomiasis PPF. This is the first study to analyze the influence of genetic factors, specifically the *MMP3* gene in PPF in a group of patients with schistosomiasis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, a region with a high mortality rate in the country<sup>2</sup>. The association between gender, age, and clinical forms was also evaluated.

In this study, the predominance of females observed in the sample is explained by the higher demand of females in health units.<sup>19</sup> It was found that the male gender and age over 41 were risk factors for the HS form of SM, due to the evolution of the disease and the greater contact with contaminated water since childhood by the male gender. These results reinforce the epidemiological pattern observed in other studies, which consider the male gender and advanced age as risk factors for death by schistosomiasis.<sup>20,21</sup> In addition, hepatosplenic complications because of chronic granulomatosis and subsequent development of PPF usually occur 5-20 years after infection and may occur in less than 10% of individuals infected with *S. mansoni*.<sup>22</sup>

The *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) has been studied among several pathologies, including liver diseases.<sup>15,16</sup> However, there are no reports of the association of this polymorphism with PPF in individuals with SM. In this study, we observed many individuals with polymorphic variants (5A5A and 5A6A) *MMP-3* distributed in both clinical groups, however, no statistically significant association was found between *MMP-3* (-1171 5A>6A) and the clinical forms of the disease.

Similarly, Stickel *et al* (2008)<sup>23</sup>, evaluated two cohorts, one German with 149 cirrhotic alcoholic patients, 220 cirrhotic alcoholic patients undergoing liver transplantation and 151 alcoholics without liver disease, and the other cohort with 320 cirrhotic alcoholics and 183 alcoholics without liver disease. In this study, there was no significant association between allele frequencies 5A and 6A *MMP3* between the groups with cirrhosis or not. Thus, the authors concluded that the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) was not related to the genetic predisposition to liver cirrhosis in alcoholics in these populations.

In contrast, ElSheshtawy *et al*<sup>24</sup> studied 20 patients with chronic hepatitis C, 20 patients with hepatocellular carcinoma (HCC), and 15 healthy individuals from Egypt and found a high

frequency of genotype 5A/6A *MMP-3* in a group of patients with both chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma when compared to the healthy group. The authors concluded that this polymorphism might be associated with the risk of developing HCC in this population.

Krishnaveni, D *et al*<sup>25</sup> evaluated the impact of *MMP-3* polymorphism (-1171 5A/6A) in 208 patients with gastric cancer and 226 healthy subjects, obtaining controversial results. They found a significant risk association of genotype 5A/6A with cases of gastric cancer compared to controls, while genotype 6A/6A was a risk factor for disease development, along with advanced age and alcoholism. The authors suggest that it is possible that, in this population, the impact of polymorphism on the etiology of gastric cancer is mild and restricted to some effect of the environment along with the genotype.<sup>22</sup>

Allelic frequency 5A *MMP-3*, as well as homozygosis for this allele, was significantly elevated in individuals with primary sclerosing cholangitis (PSC) when compared to the control group in a study that evaluated 52 PSC patients and 99 healthy individuals in the UK. In the same study, carriers of homozygous genotype 5A5A were associated with portal hypertension, which is a clinical manifestation of schistosomiasis HS form.<sup>15</sup>

Thus, the results found in this study alert to the need to consider the limitations of the common ethnic variations in the population of the state of Pernambuco, as well as the investigation of other polymorphic variations of the gene *MMP-3*, not excluding the possibility of influence of polymorphisms in the promoter regions of this gene. Thus, additional studies with larger samples involving other populations are necessary to understand the population specificity and the relative contribution of this polymorphism in the development of periportal fibrosis in schistosomiasis.

## 9. Conclusion

In conclusion, the results showed that there was no association between the *MMP-3* polymorphism (-1171 5A>6A) and the development of PPF, in addition, the male gender and age above 41 were predictive factors for HS form of the disease in this Brazilian population.

### Statement from the Ethics Committee

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco through CAAE: 66349422.4.0000.5208 in March 2023.

### Financing

This study was funded by the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

### CRedit Statement of Authors' Contribution

**Thaysa Carolina Gonçalves Silva:** Conceptualization, Data Curation, Research, Methodology, Project Administration, Writing – original draft

**Paula Carolina Valença Silva:** Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis, Research, Methodology, Project Management, Supervision, Writing – Review & Editing

**Elker Lene da Silva:** Formal Analysis, Writing – Proofreading and Editing

**Maria Tereza Cartaxo Muniz:** Resources, Conceptualization, Data Curation, Methodology, Project Administration, Supervision, Writing – Review & Editing

**Edmundo Pessoa de Almeida Lopes:** Funding Acquisition, Writing – Proofreading & Editing

**Ana Lúcia Coutinho Domingues:** Conceptualization, Data Curation, Research, Methodology, Project Administration, Supervision, Writing – review and editing

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they do not have any financial conflicts of interest or personal relationships that could influence the work reported in this article.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the patients of the Gastroenterology Outpatient Clinic of the Clinical Hospital/Federal University of Pernambuco, who participated in the study. To the Molecular Biology Laboratory of the Pediatric Oncohematology Center of the Oswaldo Cruz Hospital, where the analyses were performed.

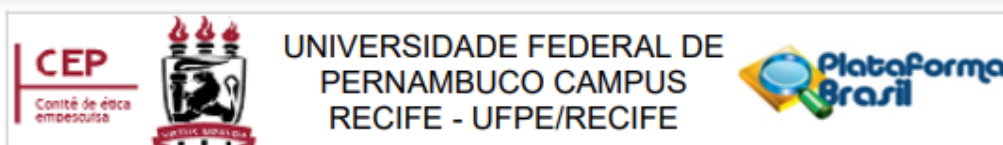
### **References**

1. Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis: Number of People Treated in 2016 Background, n.d.). Weekly epidemiological record, 49, 2017, 92, 749–760. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9249>
2. Hudson D, Cançado GGL, Afzaal T, Malhi G, Theiventhiran S, Arab JP. Schistosomiasis: Hepatosplenic Disease and Portal Hypertensive Complications. Current Hepatology Reports. 2023 Jun. 28;22(3):170–81. doi: doi.org/10.1007/s11901-023-00612-9
3. KATZ, Naftale. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76 p. [Internet]. [www.arca.fiocruz.br](http://www.arca.fiocruz.br). Centro de Pesquisa René Rachou; 2018. Available from: [www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662](http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662)
4. Silva PCV, Leal TV, Domingues ALC. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2013 Jul-Aug; 46 (4): 472-477. doi: doi.org/10.1590/0037-8682-0110-2013
5. Gomes, ECS, Domingues ALC, Constança SB. Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. Recife: Fiocruz Pernambuco, 2017. 144 p.
6. Silva PC, Gomes AV, de Souza TK, Coêlho MR, Cahu GG, Muniz MT, Domingues AL. Association of SNP (-G1082A) IL-10 with increase in severity of periportal fibrosis in

- schistosomiasis, in the northeast of Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Sep; 18(9):646-52. doi: 10.1089/gtmb.2014.0098.
7. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury repair and fibrosis. *Matrix Biology*. 2015 May-July 2015; (44–46) 147-156. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.004>
  8. Shin HP, Lee JI, Jung J, Sung-Vin Y, Kim HJ, Cha JM *et al*. Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Polymorphism in Patients with HBV Related Chronic Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2008; (53): 823-829.
  9. Meng C, Chen X, Li J, Wu Y, Liu H. Expression of MMP-P and TIMP-1 lesions of systemic sclerosis and its implications. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2008; (28): 480-482. doi: <https://doi.org/10.1007/s11596-008-0424-y>
  10. Vu HT, Hoang TX, Kim JY. All-trans retinoic acid changes matrix-metalloproteinase 2 expression and secretion in human myeloid leukemia THP-1 cells. *BioMed Research International*. 2018 Aug. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5971080>
  11. Scannevin RH, Alexander R, Haarlander TM, Burke SL, Singer M, Huo C, *et*. Discovery of a highly selective Chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation. *J Biol Chem*. 2017; (43): 17963-17974. doi: 10.1074/jbc.M117.806075.
  12. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb; 15;69(3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
  13. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun; 20(6):1600-5. doi: 10.1161/01.atv.20.6.1600.
  14. Huang X, Han L, Huang X, Guan C, Mao X, Ye Z. Impact of 5A/6A Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-3 On Recurrent Atherosclerotic Ischemic Stroke In Chinese. *International Journal of Neuroscience*. 2016; (126): 936-941. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2015.1088013>
  15. Satsangi J, Chapman RW, Haldar N, Donaldson P, Mitchell S, Simmons J, Norris S, Marshall SE, Bell JI, Jewell DP, Welsh KI. A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2001 Jul;121(1):124-30. doi: 10.1053/gast.2001.25527.
  16. Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the

- progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jul;20(7):1102-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03860.x.
17. Ritcher J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Sept 2001; 96 (suppl) doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000900023>
  18. Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001; 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  19. Albuquerque MSV, Lyra TM, Farias SF, Mendes MFM, Martelli PJJ. Acessibilidade aos serviços de saúde: uma análise a partir da Atenção Básica em Pernambuco. 2014; *Saúde Debate*. (38): 182-194. doi:10.5935/0103-1104.2014S014
  20. Simões TC, Sena R, Meira KC. The influence of the age-period-cohort effects on the temporal trend mortality from schistosomiasis in Brazil from 1980 to 2014. *Plos One*. 2020; 15(4): e0231874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231874>
  21. Pinheiro MCC, Ferreira AF, Silva Filho JDD, Lima MDS, Martins-Melo FR, Bezerra FSM, Sousa MS, Ramos AN Jr. Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial-temporal distribution, 2003-2018. *Trop Med Int Health*. 2020 Nov; 25(11):1395-1407. doi: 10.1111/tmi.13483.
  22. Masi B, Perles-Barbacaru TA, Bernard M, Viola A. Clinical and preclinical imaging of hepatosplenic schistosomiasis. *Trends Parasitol*. 2020;36(2):206–26. doi: 10.1016/j.pt.2019.11.007
  23. Stickel F, Osterreicher CH, Halangk J, Berg T, Homann N, Hellerbrand C, Patsenker E, Schneider V, Kolb A, Friess H, Schuppan D, Puhl G, Seitz HK, Leathart JL, Day CP. No role of matrix metalloproteinase-3 genetic promoter polymorphism 1171 as a risk factor for cirrhosis in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Jun; 32(6):959-65. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00654.x.
  24. ElSheshtawy NM, Nour MS, Hefny Z, Samir A. Gene polymorphisms of Interleukin 1 $\gamma$  and Metalloproteinase 3 in Hepatitis C Infected Patients and Hepatocellular Carcinoma Patients. *Egypt J Immunol*. 2017 Jan;24(1):1-8.
  25. Krishnaveni, D; Bhayal, AC; Shravan, KP1; Jyothy, A; Pratibha, N2; Venkateshwari, A. Heterozygosity of stromelysin-1 (rs3025058) promoter polymorphism is associated with gastric cancer. *Indian Journal of Cancer*. Apr–Jun 2015; 52(2):p 251-254. doi: 10.4103/0019-509X.175806

## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da influência de polimorfismos da região promotora dos genes das metaloproteinases MMP-1 (1G/2G) e MMP-3 (5A/ 6A) na fibrose periportal de esquistossomóticos em Pernambuco.

**Pesquisador:** THAYSA CAROLINA GONCALVES SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 66349422.4.0000.5208

**Instituição Proponente:** Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.932.499

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de pesquisa com finalidade de elaborar dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Apresentado pela aluna THAYSA CAROLINA GONÇALVES SILVA, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz.

#### Objetivo da Pesquisa:

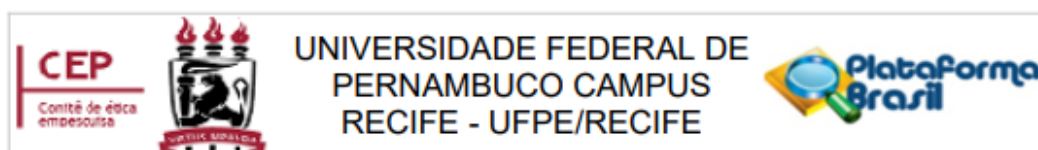
##### OBJETIVO GERAL:

Avaliar a associação entre os polimorfismos da região promotora dos genes MMP-1 (1G/2G) e MMP-3 (6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal em pacientes com a forma hepatoesplênica e FPP padrão E ou F comparados à pacientes com a forma hepatointestinal e FPP padrão A ou C.

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever as características sociodemográficas, clínicas e ambientais de pacientes com esquistossomose nas formas hepatoesplênica com fibrose hepática avançada padrão E ou F e a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A ou C;
- Identificar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos dos genes MMP-1 1G/2G, MMP-3 5A/6A entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.932.499

fibrose hepática avançada padrão E ou F com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A ou C;

- Comparar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos dos genes MMP-1 1G/2G, MMP-3 5A/6A entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com fibrose hepática avançada padrão E ou F com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A ou C;
- Verificar a associação entre os polimorfismos dos genes MMP-1 1G/2G, MMP3 5A/6A com o padrão de FPP entre pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica com FPP avançada padrão E ou F e pacientes com a forma hepatointestinal com fibrose periportal padrão A ou C.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:** Os riscos inerentes a esse tipo de pesquisa são quebra de sigilo e extravio de dados. A pesquisadora informou que serão minimizados visto que nenhuma das técnicas moleculares que serão utilizadas nessa pesquisa permitem a identificação dos participantes, além disso os dados epidemiológicos e clínicos utilizados, estão armazenados em um computador no endereço institucional sob responsabilidade da Profa. Paula Carolina Valença Silva. Desta forma, os dados provenientes desta pesquisa, apenas serão publicados em eventos científicos específicos, será garantido o sigilo das informações, bem como a anonimato dos participantes. Também foi anexado termo de compromisso e confidencialidade.

#### **BENEFÍCIOS:**

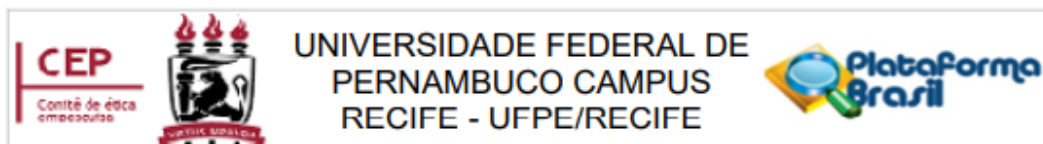
Não haverá benefícios direto aos participantes, uma vez que se trata de um estudo observacional, mas poderá haver benefício indireto para a sociedade com o incremento do conhecimento científico a respeito do tema em estudo, pois dará continuidade a análise do perfil imunogenético dos participantes, já que as amostras já foram analisadas quanto suas dosagens séricas de TNF-, IL-10, MBL, o perfil de polimorfismos desses mesmos genes e outros dados clínicos e epidemiológicos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O tema é relevante. Será um estudo do tipo transversal analítico com comparação entre grupos clínicos para averiguar a associação entre os fatores genéticos (polimorfismos das metaloproteinases MMP-1 (1G/2G) e MMP-3 (6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal em pacientes com esquistossomose após tratamento específico.

A presente pesquisa pretende utilizar o banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de pesquisa "Esquistossomose Clínica e Experimental", referente as etapas do estudo inicial "Determinação de polimorfismos dos genes

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.932.499

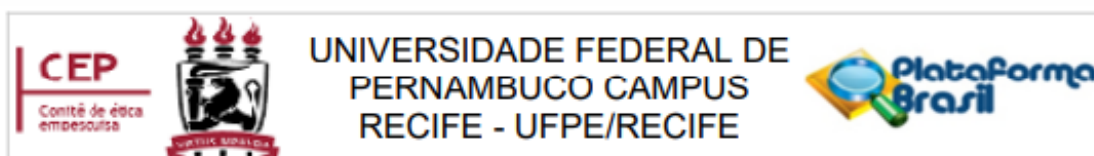
MBL, TNF- e IL-10 em portadores de esquistossomose em Pernambuco”, por meio da anuência da responsável pelo Banco de dados (Termo de autorização de uso de dados).

Desde o ano de 2012, o grupo de pesquisa Esquistossomose Clínica e Experimental” vem desenvolvendo estudos para traçar perfil clínico, epidemiológico e imunogenético de participantes da pesquisa intitulada “Determinação de polimorfismos dos genes MBL, TNF- e IL-10 em portadores de esquistossomose em Pernambuco” (SILVA, 2014). Para dar continuidade ao estudo imunogenético destes participantes, por meio da análise do impacto dos polimorfismos da região promotora dos genes MMP-1 (1G/2G) e MMP-3 (6A/5A) com a gravidade da fibrose periportal nestes participantes, será necessário explorar o biorrepositório, após a anuência da responsável pelo biorrepositório (Apêndice A), para as novas análises de Biologia Molecular. Em torno de 340 amostras de soro, de DNA e de sangue total estão inseridas no biorrepositório devidamente identificadas por códigos e pelo período de armazenamento de 10 anos, até junho de 2023. Todos os TCLE assinados pelos participantes, bem como, todas as informações epidemiológicas e clínicas que compõe o banco de dados, estão armazenados em computador sob responsabilidade da Professora Dra. Paula Carolina Valença Silva no Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, pelo período mínimo de 5 anos após o término da pesquisa. No momento da aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa para realização das coletas no ano de 2012, a atual resolução de biorrepositório RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011 provavelmente ainda estava sendo implementada, portanto os TCLEs com consentimento do uso das amostras não contêm a informação de que as amostras seriam utilizadas em pesquisas futuras. Este projeto de pesquisa será realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do CEONHPEUPE que dispõe de infraestrutura física e equipamentos de termocicladores e PCR para a realização dos experimentos de biologia molecular (Apêndice D), além do suporte financeiro de R\$3.184,85, fornecido pelo Edital de Apoio ao Pesquisador vinculado aos Programas de Pós-Graduação da UFPE (edital PROPG nº 06/2022), por meio do processo 23076.090350/2022-64, que dá aporte total ao valor necessário para o andamento da pesquisa.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados: 1 - Folha de rosto; 2 - Carta de anuência do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE-UPE) (local onde está armazenado o Biorepositório); 3 - Autorização da Prof.<sup>a</sup> Paula Carolina Valença Silva (UFPE CAV) para uso do banco de dados epidemiológicos, clínicos e imunogenéticos com biorrepositório do grupo de

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.932.499

pesquisa "Esquistossomose Clínica e Experimental"; 4 - Declaração de vínculo da mestranda; 5 - Termo de compromisso e confidencialidade; 6 - Lattes de toda a equipe de pesquisa; 7 - Projeto detalhado e modelo plataforma; 8 - Termo de dispensa do TCLE;

#### Recomendações:

Não há.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram.

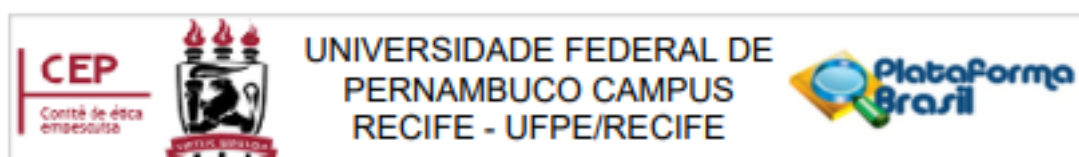
Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em [www.ufpe.br/cep](http://www.ufpe.br/cep) para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                 | Arquivo                                              | Postagem               | Autor                           | Situação |
|--------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2063809.pdf        | 22/02/2023<br>16:20:41 |                                 | Aceito   |
| Outros                         | CARTA_RESPOSTA_AS_PENDENCIA S.pdf                    | 22/02/2023<br>16:17:42 | THAYSA CAROLINA GONCALVES SILVA | Aceito   |
| Outros                         | Curriculo_Lattes_Thaysa_Carolina_Goncalves_Silva.pdf | 22/02/2023<br>16:15:58 | THAYSA CAROLINA GONCALVES SILVA | Aceito   |
| Outros                         | PROAP_APOIO_FINANCEIRO_UFPE.pdf                      | 28/12/2022<br>13:14:18 | THAYSA CAROLINA GONCALVES SILVA | Aceito   |

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** [cephumanos.ufpe@ufpe.br](mailto:cephumanos.ufpe@ufpe.br)



Continuação do Parecer: 5.932.499

|                                                                       |                                                    |                        |                                    |        |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Folha de Rosto                                                        | Folha_de_rosto.pdf                                 | 28/12/2022<br>13:12:25 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Curriculo_Lattes_Maria_Tereza_Cartaxo_Muniz.pdf    | 20/12/2022<br>16:31:36 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Curriculo_Lattes_Paula_Carolina_Valencia_Silva.pdf | 20/12/2022<br>16:28:50 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Curriculo_Lattes_Elker_Lene_Santos_d_e_Lima.pdf    | 20/12/2022<br>16:28:37 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Curriculo_Lattes_Ana_Lucia_Coutinho_Domingues.pdf  | 20/12/2022<br>16:28:19 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Termo_Confidencialidade.pdf                        | 20/12/2022<br>16:20:59 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Declaracao_de_vinculo.pdf                          | 20/12/2022<br>16:20:00 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | Carta_anuencia_CEONHPE.pdf                         | 20/12/2022<br>16:18:52 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Autorizacao_do_uso_de_arquivos_e_dados.pdf         | 20/12/2022<br>16:18:15 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | Termo_de_dispensa_do_TCLE.pdf                      | 20/12/2022<br>16:16:18 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | Projeto_detalhado.pdf                              | 20/12/2022<br>15:43:19 | THAYSA CAROLINA<br>GONCALVES SILVA | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 08 de Março de 2023

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

## ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA ACTA TROPICA

**Acta Tropica****Influence of metalloproteinase-3 (-1171 5A>6A) polymorphism on periportal fibrosis in patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil.**

--Manuscript Draft--

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Article Type:</b>         | Short Communication                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Section/Category:</b>     | Helminths, epidemiology, diagnostics, chemotherapy + control programs (incl. vectors); models; immun                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Keywords:</b>             | schistosomiasis mansoni; periportal fibrosis; polymorphisms; metalloproteinases; MMP-3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Corresponding Author:</b> | Thaysa Carolina Gonçalves Silva, Bachelor<br>Federal University of Pernambuco<br>Recife, Pernambuco BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>First Author:</b>         | Thaysa Carolina Gonçalves Silva, Master Student                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Order of Authors:</b>     | Thaysa Carolina Gonçalves Silva, Master Student<br>Paula Carolina Valença Silva, PhD<br>Elker Lene da Silva, PhD<br>Maria Tereza Cartaxo Muniz, PhD<br>Edmundo Pessoa Lopes, PhD<br>Ana Lúcia Coutinho Domingues, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Abstract:</b>             | <p>In schistosomiasis mansoni (SM), periportal fibrosis (PPF) arises due to an inflammatory response exacerbated by parasite eggs in the intrahepatic portal space, culminating in the deposition of collagen and extracellular matrix proteins. This fibrosis results from a remodeling process of the extracellular matrix, in which metalloproteinases play a significant role. The study evaluated the association between MMP-3 polymorphism (-1171 5A&gt;6A) and sociodemographic factors with PPF in individuals with SM. This is an analytical cross-sectional study involving 242 individuals infected with <i>S. mansoni</i>, of these 122 were diagnosed with hepatosplenic form (HE) and 119 hepatointestinal form (HI), all from the state of Pernambuco, Brazil. Polymerase chain reaction with restriction enzyme digestion (PsrI) was used to determine the MMP-3 polymorphism (-1171 5A&gt;6A). There was a statistically significant association between the male gender and the HE form (OR = 1.7155; 95% CI [1.0227-2.8925]; p-value = 0.0536), as well as individuals aged over 41, also had a greater chance of developing this clinical form of the disease (OR = 2.8299; 95% CI [1.5211-5.2650]; p-value = 0.0014), with greater emphasis on individuals over 61 years old (OR= 8.5541; 95% CI [3.6895-19.8326], p-value= 0.0000). There was no statistically significant association between the MMP-3 polymorphism (-1171 5A&gt;6A) between the clinical groups. In conclusion, the results showed no association between the MMP-3 polymorphism (-1171 5A&gt;6A) and the development of PPF. In addition, males, and age over 41 were predictive factors for the HE form of the disease in this Brazilian population.</p> |
| <b>Suggested Reviewers:</b>  | Alain Dessein<br>French Institute of Health and Medical Research<br>alain.dessein@univmed.fr<br><br>Christophe Chevillard<br>Immunologie et Génétique des Maladies Parasitaires<br>christophe.chevillard@medecine.univ-mrs.fr<br><br>Arnaud Violaine<br>Faculty of Medicine La Timone<br>v.arnaud@netcourier.com<br><br>Angela Maria da Silva, PhD<br>Federal University of Sergipe                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## **ANEXO C – NORMAS DA REVISTA ACTA TROPICA**

### **Article structure**

#### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### **Material and methods**

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### **Results**

Results should be clear and concise.

#### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.