

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL**

MARIA DA CONCEIÇÃO DE BARROS CORREIA



UFPE

**“FUNÇÃO PLAQUETÁRIA E O ANTÍGENO DO FATOR DE von
WILLEBRAND NA FORMA HEPATOSPLÊNICA DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI”**

RECIFE

2007

Correia, Maria da Conceição de Barros

“Função plaquetária e o antígeno do fator de von Willebrand na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni”/ Maria da Conceição de Barros Correia. Recife : O Autor, 2007.
90 folhas ; il., quadros., fig., tab., gráf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2007.

Inclui bibliografia, apêndice.

1. Esquistossomose mansoni – Função plaquetária.
2. Esquistossomose mansoni – Fator de *von Willebrand*.
3. Esquistossomose mansoni – Citometria de fluxo. I. Título.

616.995.122	CDU (2.ed.)	UFPE
616.963	CDD (22.ed.)	CCS2007-04

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL**



**FUNÇÃO PLAQUETÁRIA E O ANTÍGENO DO FATOR DE
von WILLEBRAND NA FORMA HEPATOSPLÊNICA DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Doutora em Medicina Tropical.

MARIA DA CONCEIÇÃO DE BARROS CORREIA

Orientadoras:
Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo, DSc
Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues, DSc

RECIFE
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO -

PROPESQ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Celso Anísio Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda Melo

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

CORPO DOCENTE

Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^a. Elizabeth Malagueño de Santana

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a. Gerusa Dreyer Vieira

Prof^o. Joaquim Alves Norões

Prof^a. Maria Amélia Maciel

Prof^a. Maria de Fátima Militão de Albuquerque

Prof^a. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira



RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

MARIA DA CONCEIÇÃO DE BARROS CORREIA

No dia 06 de março de 2007, às 08h00, no Auditório do Edif. das Pós-Graduações do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.S./UFPE, os Professores: **Prof.^o Dr.^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro** (Depto. de Medicina Tropical/UFPE – Membro Interno), **Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt** (Depto. de Cirurgia/UFPE – Membro Externo), **Prof.^o Dr.^a Cíntia Gonsalves de Faria Machado** (Depto. de Clínica Médica/UPE – Membro Externo), **Prof.^o Dr.^a Luzidalva Barbosa de Medeiros** (Depto. de Medicina Clínica/UFPE – Membro Externo) e **Prof. Dr. Raul Antonio Morais Melo** (Depto. de Clínica Médica/UPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram o doutorando **MARIA DA CONCEIÇÃO DE BARROS CORREIA** sobre a sua Tese intitulada “FUNÇÃO PLAQUETÁRIA E O ANTÍGENO DO FATOR DE VON WILLEBRAND NA FORMA HEPATOESPLÊNICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI”. Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof.^o Dr.^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Aprovada

Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Aprovada

Prof.^o Dr.^a Cíntia Gonsalves de Faria Machado

Aprovada

Prof.^o Dr.^a Luzidalva Barbosa de Medeiros

Aprovada

Prof. Dr. Raul Antonio Morais Melo

Aprovada

Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Prof.^o Dr.^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Carlos Teixeira Brandt
Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Cíntia Gonsalves de Faria Machado
Prof.^o Dr.^a Cíntia Gonsalves de Faria Machado

Luzidalva Barbosa de Medeiros
Prof.^o Dr.^a Luzidalva Barbosa de Medeiros

Raul Antonio Morais Melo
Prof. Dr. Raul Antonio Morais Melo

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, pelo direito de chamá-lo de **PAI** e pela consciência da essência da **VIDA**.

À minha mãe **Lourdes** "IN MEMORIAN", pela sabedoria e bela existência humana, um exemplo de vida que, certamente se aqui presente, compartilharia com entusiasmo desta Tese.

Aos meus queridos filhos, **Sabrina, Diego e Gabriel**, pela compreensão, amor, estímulo e razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À querida e admirável orientadora Prof^ª. Ana Lúcia Coutinho, pesquisadora nata com domínio completo do tema, pelo incentivo, paciência, disponibilidade, seleção dos pacientes e pelas correções.

À Prof^ª. Heloísa Ramos também orientadora, pela amizade, por acreditar no meu potencial, por ser responsável direta, na finalização desta Tese.

Aos 45 pacientes, que através da Dra. Ana Lúcia, permitiram a coleta do sangue para o estudo.

À Dra. Emília Santos, amiga e colaboradora, pela grande ajuda no setor de coagulação do HEMOPE.

À Prof^ª. Cíntia Machado de grande conhecimento em citometria de fluxo, pela sua bondade, palavras de incentivo, valiosas sugestões, e por permitir meu acesso ao laboratório do HEMOPE.

À Dra. Viviane Hora, a quem tenho grande apreço, pelo incentivo e pela ajuda na coleta e execução dos testes de coagulação.

Às Dras. Solange e Ivonisete e às técnicas Maria José e Ana, do laboratório de coagulação do HEMOPE, pela boa vontade em ajudar e ensinar.

Às Doutoradas Amélia e Anelita do setor de imunofenotipagem do HEMOPE, pela orientação e ajuda na execução dos exames.

Aos Professores do Curso de Doutorado em Medicina Tropical da UFPE, pelos ensinamentos recebidos.

Aos meus colegas da Disciplina de Hematologia, pela compreensão.

Aos meus colegas de plantão e a Diretoria do HEMOPE, pelo apoio.

Aos meus filhos Sabrina, Diego e Gabriel, pela parte gráfica.

Às minhas irmãs Helena, Norma, Socorro, Marta e Tânia pelo incentivo.

Aos Professores, Edmilson e Adiel Teixeira Filho, pelas orientações estatísticas.

Às minhas sobrinhas Silvia e Luciana, pelas orientações e correções.

À Dra. Manoela, pela colaboração e pelo apoio.

Aos meus colegas do Curso de Doutorado em Medicina Tropical da UFPE, especialmente, Stefan, Júlia e Isabel, pelos estímulos recebidos.

Às secretárias do Departamento de Medicina Clínica, pelo apoio.

Finalmente, agradeço a todos que me apoiaram e contribuíram em diversos graus, para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CD - Cluster of differentiaton
- CD62P - P selectina
- Cr⁵¹ – Cromo
- DO - Densidade óptica
- Dot Plot - Gráfico de pontos
- EDTA - Ácido tetra acético de etilenodiamina
- ELISA - Enzimaimunoensaio
- FHE - Forma hepatoesplênica
- FIT C - Conjugado de isotiocianato de fluoresceína
- FL1 - Fluorescência 1
- FL2 - Fluorescência 2
- FSC - Foward side scattered (Dispersão das células por tamanho)
- FVIII - Fator VIII da coagulação
- FvW - Fator de von Willebrand
- FvW:Ag – Antígeno do Fator de von Willebrand
- GP - Glicoproteína
- HC - Hospital das Clínicas
- HEMOPE - Fundação de Hematologia e hemoterapia de Pernambuco
- H2O2 - Peróxido de Hidrogênio
- In¹¹¹-Índio
- KDa - kilodaltons
- LOG - Logarítimo
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PACKS - Platelet Agregation Chromogenic Kinetic System
- PDGF-AB - Fator de crescimento derivado das plaquetas com cadeias polipeptídicas de transcrição simultânea A e B.
- PRP - Plasma Rico em Plaquetas
- PPP - Plasma Pobre em Plaquetas
- RMR – Região Metropolitana do Recife
- SPSS - Statistical Package for the Social Sciences
- SSC - Side Scarttered (Dispersão da luz por complexidade citoplasmática nas células plasmáticas)

THB - tetrametilbenzidina

ZM – Zona da Mata

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE GRÁFICOS	X
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. FORMA HEPATOESPLÊNICA (FHE)	21
2.2. HIPERESPLENISMO NA ESQUITOSSOMOSE MANSÔNICA	22
2.3. PLAQUETOPENIA NA ESQUITOSSOMOSE MANSÔNICA	23
2.4. PLAQUETAS - BREVES CONSIDERAÇÕES	26
2.5. FATOR DE von WILLEBRAND (FvW)	30
CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS	32
3.1. GERAL	32
3.2. ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO 4 - MÉTODOS	33
4.1. PROCEDIMENTOS ÉTICOS	33
4.2. CASUÍSTICA	33
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
4.4.1. Operacionalização e categorização das variáveis	35
4.4.2. Elenco de variáveis	35
4.4.3. Elenco de co-variáveis	36
4.5. PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	37
4.5.1. Instrumentos	37
4.5.2. Coleta da amostra execução dos testes	37
4.5.3. Agregação plaquetária	38
4.5.4. Citometria de fluxo	41
4.5.5. Fator de von Willebrand	44

4.6. TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4.6.1. Análise estatística	45
4.6.2. Limitações metodológicas do estudo	46
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS	47
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA	47
5.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS	56
CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO	62
6.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA	62
6.2. METODOLOGIA	63
6.3. COMENTÁRIOS DOS RESULTADOS	64
6.3.1. Citopenias	64
6.3.2. Macroplaquetas	64
6.3.3. Avaliação da agregação plaquetária	65
6.3.4. Citometria de fluxo – Quantificação do CD41, CD42b	65
6.3.5. Antígeno do fator de von Willebrand	66
6.3.6. Análise comparativa das variáveis estudadas	67
6.3.7. Considerações finais	68
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES	71
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS	72
Apêndice 1. Termo de consentimento livre esclarecido	
Apêndice 2. Ficha clínica	
Apêndice 3. Ficha de coleta de exames - HEMOPE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de agregação plaquetária com Colágeno do paciente 45 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica	39
Figura 2	Curva de agregação plaquetária com ristocetina do paciente 45 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica	40
Figura 3	Curva de agregação plaquetária com Adrenalina do paciente 45 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica	40
Figura 4	Curva de agregação plaquetária com ADP do paciente 45 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica	41
Figura 5	Gráfico de dispersão das plaquetas por tamanho e comprimento plasmático – FSC X SSC do paciente 5 com esquistossomose mansoni na forma hepatoesplênica	43
Figura 6	Gráfico de pontos “Dot Plot” do controle negativo	43
Figura 7	Gráfico de pontos “Dot Plot” com o CD41 FITC, em plaquetas do paciente número 5 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica.....	43
Figura 8	Gráfico de pontos “Dot Plot” com CD 42b FITC, em plaquetas do paciente número 5 com esquistossomose mansoni forma hepatoesplênica.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1	Avaliação da agregação plaquetária nos pacientes com esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica	51
Gráfico 2	Distribuição dos 34 pacientes esquistossomóticos com a forma hepatoesplênica segundo a dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Elenco de Variáveis	35
Quadro 2	Elenco de Co-variáveis	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica por idade e sexo	47
Tabela 2	Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica por região da procedência atual segundo a região da naturalidade	48
Tabela 3	Distribuição dos 45 pacientes segundo a citopenia e a ocorrência ou não de macroplaquetas	49
Tabela 4	Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica segundo os testes de agregação plaquetária com Adrenalina, ADP, Ristocetina e colágeno	50
Tabela 5	Avaliação dos anticorpos monoclonais CD41 e CD42b em 42 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica	51
Tabela 6	Resultados dos valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação do número de plaquetas, diâmetro longitudinal do baço e da dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand nos pacientes estudados com esquistossomose forma hepatoesplênica	52
Tabela 7	Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica segundo diâmetro longitudinal do baço, presença de varizes do esôfago e hemorragia digestiva	53
Tabela 8	Distribuição dos 43 pacientes esquistosomóticos hepatoesplênicos segundo a fibrose periportal de acordo com os sistemas de classificação adotados	54

Tabela 9	Avaliação dos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica quanto ao número de plaquetas segundo o tamanho do baço	56
Tabela 10	Avaliação do número de plaquetas segundo a classificação da fibrose pelo critério de Cairo e de Niamey em 43 pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica	57
Tabela 11	Avaliação do nível do Antígeno do Fator de von Willebrand segundo as variáveis: ocorrência de varizes do esôfago, diâmetro longitudinal do baço, grau de fibrose periportal pela classificação de Cairo e de Niamey e a Agregação com Ristocetina em 34 pacientes com esquistossomose mansoni FHE	59
Tabela 12	Avaliação do nível do Antígeno do Fator de von Willebrand segundo número de plaquetas em 34 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica	60
Tabela 13	Avaliação do nível do antígeno do Fator de von Willebrand segundo o número de plaquetas acima e abaixo de 100.000mm ³ em 34 pacientes esquistossomóticos FHE	61

RESUMO

Com o objetivo de se verificar a existência de alterações da morfologia plaquetária, de seus antígenos de superfície, da agregação das plaquetas e da dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) em portadores de esquistossomose mansônica na sua forma hepatoesplênica compensada, foram estudados 45 indivíduos, adultos, entre 22 a 83 anos, de ambos os sexos, com ou sem plaquetopenia, sem comorbidades, com sorologia para hepatite viral B ou C negativa, sem passado transfusional nos últimos 90 dias que antecederam à coleta do sangue, não alcoolatras, nem usuários de medicamentos hepatotóxicos, anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários. Foram realizados hemograma completo, ultra-som do abdome superior, endoscopia digestiva alta, agregação plaquetária com ADP, Epinefrina, Colágeno e Ristocetina, Imunofenotipagem por citometria de fluxo com os anticorpos CD42b e CD41. O antígeno do FvW foi determinado pelo teste de ELISA (Stago diagnostica). Após o estudo, constatou-se que mais de 90% dos pacientes não apresentavam alterações dos antígenos de membrana GPIb e IIb/IIIa avaliados pelos anticorpos CD42b e CD41 respectivamente; o número de plaquetas encontrado, na maioria dos pacientes, foi abaixo de $100.000/\text{mm}^3$, levando a hipoagregação com agonistas na maioria dos casos. O FvW:Ag nos pacientes analisados foi elevado ou muito elevado. Estatisticamente, encontrou-se associação inversa significativa para variáveis do número de plaquetas, diâmetro longitudinal do baço e o FvW:Ag ($p < 0.05$). Houve associação entre o FvW:Ag, o diâmetro longitudinal do baço e a presença de varizes de esôfago. Concluiu-se que a elevação do FvW:Ag e os valores numericamente normais do CD 42b, encontrados neste trabalho, parecem manter a adesão plaquetária estável; que a agregação, também parece está normal quando ligada ao fibrinogênio, assim como, a expressão das GPIIb/IIIa pelos resultados obtidos com o CD41, e por fim que os testes de agregação plaquetária, induzidos pelos agonistas (ADP; colágeno; ristocetina e adrenalina) e realizados pelo agregômetro PACKS, mostraram-se alterados nos pacientes com esquistossomose porque, apesar da grande especificidade, pois são dependentes de um número de plaquetas normal. Estes achados explicam a não ocorrência de sintomatologia decorrente da plaquetopenia tais como: petéquias, equimoses, gengivorragias, em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

Palavras Chaves ou Descritores: Esquistossomose mansoni - Citometria de Fluxo - Glicoproteína de membrana de plaqueta - Agregação plaquetária - Fator de von Willebrand.

ABSTRACT

To verify variations at platelet morphology, platelet aggregation, surface antigens on these platelets and at the plasma levels of von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) in patients with compensated hepatosplenic schistosomiasis, 45 individuals were studied. These patients were all adults, (22 to 83 years old), from both gender, with or without thrombocytopenia, absence of others comorbidities, no alcoholism, negative sorologies to hepatitis B and C virus. They also could not have any transfusions in the last 90 days before collecting the samples; hepatotoxic drugs, anticoagulants and antiplatelet therapies were also forbidden. Red blood count, transabdominal ultrasonography, upper gastrointestinal endoscopy, platelet aggregation (induced by ristocetin, collagen, adenosine diphosphate and epinephrine), flow cytometric assays with the CD 42b and CD 41 antibodies. The von Willebrand factor antigen was measured by ELISA (Stago diagnostica). After the analysis, the results showed that 90% of the patients did not showed changes of the membrane antigens GPIb and IIb/IIIa when evaluated by the CD 42b and CD 41 antibodies respectively; the platelet count, in the majority of patients, was under $100,000/\text{mm}^3$ wich induced a hypoaggregation with agonists in the majority of cases. The vWF:Ag, in the analyzed patients, was high or very high. Estatically, significative inverse association was found to the varieties of the platelet count, longitudinal diameter of the spleen and the vWF:Ag ($p < 0.05$). There was association between the vWF:Ag, the longitudinal diameter of the spleen and the presence of esophagus' varices. It was concluded that the elevation of the vWF:Ag and the normal values of CD 42b, found in this study, seem to keep the platelet adhesion steady and that the platelet aggregation also seems to be normal when bind to the fibrinogen, as well as the GPIIb/IIIa expression with the results obtained with the CD41. The platelet aggregation tests induced by the agonists (ristocetin, collagen, adenosine diphosphate and epinephrine) and done by aggregometry (PACKS), were not normal in patients with schistosomiasis because, although the high specificity, they are dependent of a normal platelet count. These findings explain why there are no symptoms associated with thrombocytopenia like petechiae, ecchymoses, gingival bleeding in patients with hepatosplenic schistosomiasis.

Keywords or describers: Schistosomiasis mansoni - Flow cytometric assay – Platelet membrane glycoprotein – Platelet aggregation – von Willebrand Factor.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A esquistossomose é causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* que habitam o sistema venoso portal e vesical do homem e de alguns animais (KELLY; SUMMERFIELD, 1994; MOTA et al 1994). São seis as espécies de esquistossomos que parasitam o homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma malayensis*, *Schistosoma mekongi* (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A esquistossomose aparece como endêmica em 74 países; no quais 600 milhões de indivíduos estão expostos, com mais de 200 milhões, afetados (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; MOTTA et al., 1994; KATZ; ALMEIDA, 2003). No Brasil, calcula-se que o número de pessoas infectadas pelo *Schistosoma mansoni* seja de aproximadamente 6 a 10 milhões e outras 30 milhões expostas à infecção (FERREIRA; COUTINHO, 1999; AMARAL et al., 2002; ROSS et al., 2002; BRANDT; et a.l, 2003; PETROIANU, OLIVEIRA, ALBERTI, 2004). Segundo dados de 2005 da OMS, apesar da diminuição da frequência de formas graves, não ocorreu modificação no número de pessoas infectadas.

Cerca de 5 a 7% dos indivíduos parasitados que adquirem uma maior carga de infecção ou são expostos a reinfecções sucessivas, devido, provavelmente, à deficiência de imunidade protetora, evoluem para a forma hepatoesplênica (ASFORA; DOMINGUES; COUTINHO, 1978; BUTTERWORTH, 1990; PEREIRA et al., 1993; DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; DOMINGUES; PEREIRA; BARRETO, 2004).

O Nordeste é a principal região hiperendêmica do país e em especial, os estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, com prevalência acima de 60% e até 80% da população, em algumas localidades da zona rural. Nestas localidades de alta prevalência, ocorrem inúmeros casos de formas graves da doença. Casos recentes de infecção aguda foram encontrados em praias do litoral de Pernambuco e na capital (PEREIRA, 1986; COUTINHO; DOMINGUES, 1993; BARBOSA; SILVA; BARBOSA, 1996).

A esquistossomose apresenta-se de formas clínicas diversas, ocorrendo nos últimos anos, redução do número de casos da forma hepatoesplênica, após várias

campanhas no Brasil, de tratamento em massa, realizadas pelo Ministério da Saúde (BINA, 1992; PEREIRA; TÁVORA, 1994).

Atualmente, pacientes com a forma hepatoesplênica são encontrados onde a prevalência da doença excede 25% e esta forma clínica tem predominado em pacientes entre 40-60 anos (BARBOSA.; GONÇALVES.; MELO, 1995).

Dentre as manifestações clínicas da forma hepatoesplênica, as mais comuns são: hepatoesplenomegalia, hipertensão porta e sangramentos por ruptura de varizes esofágicas. No Brasil a esquistossomose mansônica constitui a causa mais freqüente de hipertensão porta e esplenomegalia. Na forma hepatoesplênica da esquistossomose, a esplenomegalia é secundária à congestão venosa e hiperplasia das células do sistema retículoendotelial (BAGSHAW, 1979; GUERRA et al., 1985; DOMINGUES; BARRETO, 2001).

As anormalidades da coagulação encontradas nas formas mais avançadas das doenças hepáticas são complexas, multifatoriais e dependem do equilíbrio entre a síntese hepática, do clearance das proteínas da coagulação ativadas e seus inibidores, da elevação do antígeno do Fator de von Willebrand, disfibrirogenemia, hiperfibrinólise, trombocitopenia, função plaquetária anormal e coagulação intravascular disseminada (STEIN; HARKER, 1986; JOIST, 1994; BEER et al., 1995; LIMA, 1996). No entanto, para a grande maioria dos indivíduos portadores de esquistossomose hepatoesplênica a função hepática é conservada e não se observam grandes alterações nas proteínas da coagulação. Consideram-se ainda como manifestações hematológicas da hepatopatia esquistossomótica, as citopenias, tendo o hiperesplenismo papel fundamental na sua gênese (EICHNER; 1979). Maia (2002) encontrou relação entre o tamanho do baço e a intensidade das citopenias. A anemia habitualmente normocítica e normocrômica, podendo ser também microcítica hipocrômica, quando a etiologia for multifatorial, isto é, quando associada a hemorragia digestiva, parasitoses intestinais e desnutrição (PRANKERD, 1963; COUTINHO; DOMINGUES, 1993; LWAMBO et al., 1999). Quando o mecanismo do hiperesplenismo ocorre na esquistossomose, a leucopenia se caracteriza por ser balanceada, ou seja, a relação entre granulócitos, linfócitos e monócitos, tende a permanecer inalterada (EICHMER, 1979). Souza; Toledo; Borges, (2000) encontraram em portadores de esquistossomose mansônica, na

forma hepatoesplênica compensada, leucopenia em 50% e anemia em 25% dos doentes.

A maioria dos pacientes com forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni apresenta diminuição das plaquetas, embora mais de 25% até 50%, dos casos nas mesmas condições podem apresentar número normal de plaquetas, não existindo ainda explicação na literatura para esta seletividade (COUTINHO; LIRA, 1956; MAIA, 2002). É possível que a própria infecção pelo *Schistosoma mansoni* afete o número e a função das plaquetas como foi sugerido por Joseph et al. (1983), em modelos experimentais em camundongos, através de reação imune do hospedeiro. Os mesmos autores, também observaram que camundongos com redução de células T e infectados pelo parasito não apresentaram trombocitopenia significativa.

Por outro lado, a plaquetopenia tem sido relatada em torno de 75% dos pacientes com a forma hepatoesplênica mais avançada, isto é, com episódios de hemorragia digestiva alta (MAIA, 2002; STRAUSS, 2002). Foi observado que níveis séricos da trombopoetina não influenciaram o aparecimento da trombocitopenia esquistossomótica (SOUZA et al., 2002). A trombocitopenia tem sido usada como um preditor indireto e não-invasivo da hipertensão portal na esquistossomose (SOUZA; TOLEDO; BORGES, 2000).

A fagocitose secundária ao hiperesplenismo tem sido descrita como causa da plaquetopenia na maioria dos casos (COUTINHO; DOMINGUES, 1993). Estudos utilizando plaquetas marcadas com In^{111} e/ou Cr^{51} comprovaram o encurtamento no tempo médio de sobrevivência das mesmas, reforçando a idéia do seqüestro esplênico e destruição como principal causa da diminuição da plaqueta em pacientes com esplenomegalia (HUSSEIN; LEE; SCHIFFER, 1990; LWAMBO et al, 1999; MAIA, 2002). Petronianu; Oliveira; Alberti, (2004) ressaltaram que além do seqüestro e destruição esplênica das plaquetas na esquistossomose, há um represamento destas dentro do baço pela dificuldade na drenagem sangüínea provocada pela hipertensão porta.

Em pacientes cirróticos, além da plaquetopenia há alterações na função plaquetária através de diminuição da agregação (THOMAS, REAM; STUART, 1967). Beer et al., 1995; Lisman; Leebeek; Groot, (2002) descreveram a elevação do FvW:Ag nesses pacientes. Na esquistossomose, ainda não há estudos suficientes

sobre alterações da função das plaquetas e do FvW:Ag. No entanto, pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica apresentam hemorragias digestivas graves, com complicações agravadas pela plaquetopenia. Em acréscimo, o FvW, dentre outros elementos associados à hipertensão arterial pulmonar, em pacientes esquistossomóticos, participa, na lesão do endotélio vascular da formação de microagregados plaquetários. Isto poderia explicar que o aumento da hipertensão arterial pulmonar contribuiria com a plaquetopenia (LOPES; MAEDA; BYDLOWSSKI, 1998).

Justifica-se, pois este estudo, devido ao desconhecimento, do comportamento do FvW na esquistossomose FHE e para uma melhor compreensão da função plaquetária. Para esse fim, procurou-se verificar a existência de alterações morfológicas plaquetárias e seus antígenos de superfície, da agregação das plaquetas e da dosagem do FvW em portadores nessa fase dessa enfermidade.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária crônica causada pelo *Schistosoma mansoni* através da penetração ativa das cercárias na pele humana e pela invasão do sistema circulatório. Os vermes adultos habitam nas veias do sistema porta e são mais frequentemente encontrados nas veias tributárias da mesentérica inferior, com deposição dos ovos, principalmente, na região retossigmoidiana (MALAGUEÑO; SANTANA, 1994).

Cada fêmea produz em torno de 300 ovos por dia. Uma parte desses ovos ultrapassa a barreira do vaso e, através da liberação de enzimas proteolíticas dos miracídios e aliados à espícula lateral do ovo e ao próprio peristaltismo do intestino, chega à luz intestinal, sendo eliminados nas fezes. Outra parte dos ovos fica na mucosa do intestino, causando reação granulomatosa local com migração de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos e um terço deles são carreados pelo sangue e chega ao fígado onde também desencadeia reação inflamatória granulomatosa (CARREIRO et al, 1983; RASO; PEDROSO, 1987; PRATA, 1991).

Os ovos provocam a liberação de citocinas durante a reação inflamatória e estimulam a proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno nos espaços portais e a formação de fibrose. Os vermes adultos não produzem reação inflamatória nos vasos, mas desencadeiam uma resposta imune de intensidade variável através da liberação de substâncias antigênicas que vão ser responsáveis pela resistência à infecção. Esta imunidade protetora decorre da produção de IgE, antiverme que começa a ser produzido em torno do 15º ano de vida, quando se nota uma redução abrupta do número de ovos nas fezes e menor percentual de reinfecção nos jovens infectados (BUTTERWORTH, 1990). Isso explica a maior susceptibilidade das crianças à reinfecção. Há uma relação entre o número de ovos eliminados nas fezes (técnica de Kato/Katz) e a carga parasitária do hospedeiro. À medida que a infecção torna-se crônica, diminui o número de ovos nas fezes, na fase hepatoesplênica (DOMINGUES et al., 1983).

2.1. FORMA HEPATOESPLÊNICA (FHE)

A forma hepatoesplênica representa um tipo peculiar de hepatopatia crônica pela presença de grossas faixas de fibrose em torno dos ramos portais que desencadeiam esplenomegalia, hipertensão portal, muitas vezes severa, com função hepática normal, exceto na forma descompensada. Nessa fase crônica da doença, as manifestações clínicas da hipertensão portal predominam sobre a insuficiência hepatocelular. Wyszomirska et al., (2005) encontraram níveis elevados do colágeno IV e laminina na esquistossomose, desde as fases iniciais até as formas mais avançadas, podendo ser útil para detecção de progressão da doença. A FHE é considerada a forma mais típica de doença. É representada do ponto de vista histológico pela fibrose periportal, fibrose de Symmers que ocorre em indivíduos com carga parasitária elevada, com reinfecções freqüentes e resposta imune acentuada (DOMINGUES;PEREIRA;BARRETO,2004).

Estudo de 232 necropsias de casos com fibrose de Symmers, as alterações microscópicas e aumento do tamanho do baço foram observados em 220 (95% dos casos) (ANDRADE; BINA, 1983). A forma hepatoesplênica da doença surge entre 5 a 15 anos após a infecção. Na fase aguda da doença, pode ser encontrada também uma esplenomegalia reativa (COUTINHO; DOMINGUES, 1993), diferente da esplenomegalia congestiva da forma hepatoesplênica.

Silveira et al., (1995) observaram que na forma hepatoesplênica da esquistossomose 70,6% dos portadores estão acima dos 40 anos, sendo a raça branca mais atingida 59,3%, seguida da raça mulata com 35,2% e da raça negra 5,5%. Esta forma se desenvolve em indivíduos que mantém contato contínuo com o foco de infecção e a sua freqüência tem relação com o número de ovos eliminados nas fezes.

A esplenomegalia e o hiperesplenismo não resultam da invasão do parasito ou de seus ovos no baço, mas de fatores mecânicos relacionados com a estase venosa secundária, a hipertensão porta (COUTINHO; LYRA, 1956), associados com resposta imune ao parasita, que desencadeiam hiperplasia das células do sistema retículoendotelial desde o período inicial ou invasivo (FERRAZ et al., 2001).

A ultra-sonografia tem sido utilizada nos últimos anos como um método sensível para diagnóstico da Fibrose de Symmers. Foram propostas diferentes

classificações ecográficas para graduar a intensidade da fibrose observada pelo ultra-som (DOMINGUES, 1998). As mais utilizadas são a de Cairo (Cairo Working Group, 1992; Niamey (Niamey Working Group, 2000), ambas propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

A classificação de Cairo (1992) é mais utilizada na forma hepatoesplênica e descreve a fibrose em três graus, dependendo da espessura das paredes dos ramos porta após a terceira bifurcação intrahepática:

Grau I - espessura > 3 a 5 mm.

Grau II - espessura > 5 a 7 mm.

Grau III - espessura > 7 mm.

A classificação de Niamey (2000) é baseada em padrões de imagens preestabelecidos, sendo o método mais sensível para as formas iniciais do acometimento hepático que a classificação de Cairo. Trata-se de uma definição qualitativa dos padrões de fibrose:

Padrões C - Fibrose periférica.

D - Fibrose central.

E - Fibrose avançada.

F - Fibrose muito avançada.

2.2. HIPERESPLENISMO NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Hiperesplenismo é uma síndrome no qual a esplenomegalia se associa à citopenia. Classicamente é definido como:

- Esplenomegalia;
- Diminuição do número de um ou mais elementos celulares do sangue periférico isolado ou em qualquer combinação;
- Medula óssea normal ou hiper celular;
- Correção da citopenia após a esplenectomia.

Com base na histologia e imunohistoquímica, as principais alterações encontradas no baço aumentado de pacientes esquistossomóticos são: dilatação congestiva dos seios venosos e espessamento difuso de cordões esplênicos. Adicionalmente, os linfócitos esplênicos apresentam características específicas no

que diz respeito à resposta imune e ao aumento do número de fagócitos encontrados no baço, essas células contribuem para o seqüestro e destruição de outras células, principalmente leucócitos e secundariamente hemácias e plaquetas (BRUBARKER; JOHNSON, 1978; CARVALHO; JESUS, 2003).

De acordo com a literatura, o hiperesplenismo associado à hipertensão porta de qualquer etiologia ocorre entre 30% a 70% dos casos (PETROIANU, 2004).

O tratamento cirúrgico associando à esplenectomia com ligadura da veia gástrica esquerda e a esclerose endoscópica nos casos de recidiva hemorrágica melhoraram a sobrevida dos pacientes (LACERDA et al, 1993; DOMINGUES; COUTINHO, 1997). Nas crianças, a esplenectomia com auto-implante esplênico durante cirurgia fez desaparecer a mortalidade por sépsis pós-esplenectomia (BRANDT; ARAÚJO; BARBOSA, 1998).

2.3. PLAQUETOPENIA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A plaquetopenia observada em portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose é amplamente conhecida e costuma ser atribuída ao hiperesplenismo (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; MAIA, 2002). Em vários estudos hematológicos na esquistossomose mansônica (STRAUSS, 2002; SOUZA; BORDIN; BORGES, 2003), tem sido descrito, em portadores da forma hepatoesplênica compensada da esquistossomose, plaquetopenia ocorre entre 50 a 75%, leucopenia em torno 54%, anemia em 20 a 25% dos pacientes com significativa correlação entre plaquetopenia e leucopenia.

Para Brubarker; Johnson (1978), a plaquetopenia periférica decorre do aumento do compartimento plaquetário esplênico em função do crescimento do órgão e da estase, porém sem a sua destruição. As plaquetas, provavelmente pelo seu tamanho pequeno, passariam livremente através das fenestrações entre os seios e os cordões esplênicos. Estudos mostraram que na esplenomegalia congestiva, a soma das plaquetas circulantes com as retidas no baço é igual à massa plaquetária normal (GUERRA et al., 1985). Por outro lado, Dittrich et al., (2005) não conseguiram demonstrar de forma significativa, associação entre plaquetopenia e o grau de hipertensão porta, com o grau de disfunção hepatocelular em pacientes com doença hepática crônica.

As cifras plaquetárias na esquistossomose mansônica são extremamente variáveis, desde valores reduzidos até a normalidade. A maioria dos autores considera nível normal acima de $150.000/\text{mm}^3$. Silva;Chieffi;Carrilho,(2004), correlacionavam plaquetopenia abaixo de $130.000/\text{mm}^3$ com a presença da FHE e hipertensão porta. A proporção de plaquetas seqüestradas aumenta com o tamanho do baço podendo atingir 90% da massa total (BAWDLER, 1983; AMITRANO et al., 2002).

As anormalidades plaquetárias encontradas na hepatite aguda ou crônica parece ser decorrente da ação do vírus sobre o megacariócito, levando-o à alteração com redução da plaquetogênese e também pela interação do vírus com as plaquetas circulantes, resultando em ativação e remoção das mesmas da circulação por imunocomplexos. Ocasionalmente, na hepatite, ocorre trombocitopenia severa secundária a Aplasia Medular que resulta da agressão do vírus a Stem Cell. Disfunção das plaquetas observada nestes casos envolve alteração estrutural e da agregação com maior significado em trombocitopenias severas (JOIST,1994).

Na hepatite fulminante, a trombocitopenia ocorre pela presença de coagulopatia de consumo (PÁRAMO; ROCHA, 1993).

Na cirrose hepática de outras etiologias, exceto por álcool, a redução do número de plaquetas é decorrente da esplenomegalia congestiva, seqüestro pelo baço e mecanismo imune mediado pela IgG, IgM, C3 e C4,sem a compensação pela medula óssea (AMITRANO et al., 2002). Recentemente, estudos com a citometria de fluxo em pacientes cirróticos mostraram redução do número de plaquetas reticuladas, indicando também redução na sua produção (KOIKE et al., 1998).

Nos casos de hepatopatia por álcool, a plaquetopenia também pode ocorrer por deficiência de ácido fólico, ação do etanol nos megacariócitos e nas plaquetas circulantes (LISMAN et al., 2002).

VAN THIEL et al., (2004) relataram que em pacientes com doença hepática avançada, a trombocitopenia pode ocorrer pela coagulopatia de consumo crônica, pela redução da síntese de trombopoetina pelo fígado, hipertensão porta, pelo seqüestro esplênico e pela redução da meia vida das plaquetas em certas doenças hepáticas por mecanismo autoimune. Além disso, o uso de inibidores da bomba de prótons, antagonistas H₂, antibióticos usados para tratamento da encefalopatia e para prevenir peritonite bacteriana espontânea, contribuem para a plaquetopenia.

Nestes casos, a agregação e adesão estão reduzidas, a síntese e liberação de óxido nítrico e prostaciclina pelas células endoteliais estão aumentados. Verifica-se a redução da produção do Tromboxane A₂ e um baixo grau de proteólise dos receptores de plasmina na superfície da plaqueta comprometendo sua funcionalidade (PÁRAMO; ROCHA, 1993; LISMAN et al., 2006).

Níveis elevados do Fator de von Willebrand ocorreram como resultado da disfunção endotelial e redução da adesividade das plaquetas, entretanto a relação dos multímeros de alto e baixo peso molecular estavam reduzidos no plasma devido a redução dos níveis da proteína de clivagem do FvW, principalmente nos casos de cirrose avançada (VAN THIEL et al., 2004)

Panasiuk et al., (2005), em estudos usando citometria de fluxo, em pacientes com cirrose hepática, demonstraram que a ativação das plaquetas e dos monócitos representavam importante papel e que o desenvolvimento da trombocitopenia poderia ser decorrente do consumo das plaquetas nos agregados monócitos-plaquetas.

A fisiopatogenia da plaquetopenia na esquistosomose hepatoesplênica ainda não está totalmente compreendida. Possivelmente, há um mecanismo multifatorial. O papel da hipervolemia provocada pela hipertensão porta já é bem conhecido. Há algumas evidências para sugerir que há acelerada destruição plaquetária associada com esplenomegalia. Nestes casos, o número de megacariócitos na medula é normal ou aumentado e as plaquetas são menores do que naqueles com plaquetopenia autoimune (LEE et al., 1998). A observação do tamanho das plaquetas é útil na elucidação da etiologia da plaquetopenia, pois, macroplaquetas podem ser vistas como resultado de acelerada produção medular, enquanto que a ausência de plaquetas grandes em pacientes com trombocitopenia sugere que há defeito na produção (BAIN, 2004).

2.4. PLAQUETAS: BREVES CONSIDERAÇÕES

As plaquetas são produzidas na medula óssea após maturação e fragmentação do citoplasma do megacariócito. Possuem forma discóide, são anucleadas, medindo de 2 a 4 μ de diâmetro e 0,6 a 1,2 micra de espessura. Possuem meia vida em torno de 7 a 10 dias. A maioria das plaquetas é removida após este período e uma boa parte é consumida diariamente, cerca de 7000/ml, no processo da hemostasia. (FROJMORIC; PANJWANI, 1976)

Parece que as plaquetas mais jovens, as macroplaquetas são mais ativas no processo hemostático. As plaquetas senescentes são reconhecidas pelo sistema macrofágico presente no baço e no fígado (THOMPSON et al., 1984).

No processo de formação das plaquetas, estão envolvidos, além das células, fatores de crescimento, como a trombopoetina, a participação do fator estimulador de colônia de granulócitos - macrófagos (GM-CSF), interleucina 3, interleucina 6 e eritropoetina (METCALF, 1994).

A estrutura das plaquetas pode ser dividida em zona periférica, zona gel e zona das organelas. A zona periférica representa uma barreira entre os constituintes intracelulares e plasmáticos, porém sua composição exata não é bem definida. Glicoproteínas, fibronectina, fibrinogênio e outros fatores da coagulação (VII, VIII, X, XII, XIII) são adsorvidos em sua superfície (PUOL-MOIX, 1995). Segundo Parise; Smyth; Coller, 2001; Bennett, (2004), na zona periférica, a membrana é constituída por uma dupla camada fosfolipídica (contendo o Fator Plaquetário 3 ao qual se ligam fatores vitamina K dependentes), proteínas e glicoproteínas (GP). Estas últimas desempenham papel de receptores, mediando as funções de adesão, agregação e ativação plaquetárias.

As glicoproteínas são classificadas em distintas famílias:

A) Integrinas, em que temos os receptores para a fibronectinas, colágeno, laminina, fibrinogênio e vitronectina;

B) Glicoproteínas, ricas em leucinas interagem com receptor para o Fator de von Willebrand;

C) Selectinas, conhecida também como P-selectina, encontrada nos grânulos alfa, se expressam na superfície das plaquetas ativadas, mediando a interação das plaquetas ativadas com os neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de células T.

O complexo formado pelas glicoproteínas (GPIa/IIa) e (GPIb/IX) tem, respectivamente, importância para adesão das plaquetas ao colágeno e ao Fator de von Willebrand (Fv W) existentes na região subendotelial.

As glicoproteínas (GPIIb/IIIa) interagem com o fibrinogênio plaquetário que atua como ponte entre estas e outras plaquetas, participando da agregação.

A zona gel ou citoplasma é constituída por microtúbulo, microfilamentos de actina e miosina, responsáveis pela emissão de pseudópodos pela contração e secreção das mesmas durante sua ativação. O citoplasma contém mitocôndrias, lisossomos, aparelho de Golgi, acúmulo de glicogênio e o sistema tubular denso, local da síntese de prostaglandinas. (PUOL-MOIX, 1995).

A zona das organelas são formadas pelo menos por 2 tipos de grânulos:

A) Grânulos Densos - são invaginações da membrana citoplasmática, formando um sistema canalicular aberto que aumenta a superfície plaquetária. São ricos em ADP, ATP, serotonina e cálcio que são liberados durante a ativação das plaquetas e necessários para recrutamento de outras plaquetas para o local da lesão endotelial;

B) Grânulos alfa - contém Fibrinogênio plaquetário, albumina, fator V, plasminogênio, fator de von Willebrand (FvW), IgG, fator plaquetário 4 (FP4), que tem ação antiheparina , beta tromboglobulina (que inibe a produção de prostaciclina pelo endotélio) , fator de crescimento derivado das plaquetas, fator transformador de crescimento beta e a P-selectina, fibronectina, trombospodina e fator mitogênico plaquetário que estimula a proliferação de células musculares lisas na parede do vaso (PUOL-MOIX, 1995).

As plaquetas têm receptores específicos para vários agonistas fisiológicos. Os agonistas são substâncias que reagem com receptores de superfície da membrana plaquetária e ajudam em sua função. São eles: ADP, adrenalina, serotonina, trombina, fibras de colágeno e o ácido aracdônico.

Após interação do agonista com o receptor de membrana plasmática plaquetária, ocorre ativação das mesmas com a modulação da atividade dos canais iônicos, enzimas associadas com a membrana citoplasmática e geração do segundo mensageiro, que transmite sinal ao sistema efetor responsável pela sua ativação. (SIESS, 1989).

Os receptores para os agonistas também interagem com a GP para ativar fosfolipase C, fosfolipase A2, tirosinaquinase, além de suprimir a formação de AMP cíclico (BRASS; HOXIE; MANING, 1993).

A mudança de forma da plaqueta leva a despolimerização reversível dos microtúbulos e o seu deslocamento da periferia para o centro e a fosforilação da miosina leva à formação de um gel contrátil, levando a alteração da forma e centralização dos grânulos alfa.

A secreção pelos grânulos densos e alfa é iniciada em resposta a ativação plaquetária, contração da actina-miosina responsável pela centralização e a conseqüente fusão entre os grânulos e o sistema canalicular aberto com exposição das proteínas das membranas dos grânulos, contribuindo com a expressão de glicoproteínas.

A ativação plaquetária compreende os processos de adesão ao subendotélio vascular (fibras de colágeno e microfibrilas), mudança de forma discóide para esférica, emitindo pseudópodes através dos quais elas se mantêm aderidas ao vaso lesado, agregando outras plaquetas, secretando substâncias procoagulantes, com formação do tampão plaquetário (THOPSON et al 1984; MICHELSON, 1996).

Durante o processo de agregação o ADP liga-se ao seu receptor específico na membrana e induz a mudança de forma, que é seguida pela exposição de sítios de ligação (GPIIb/IIIa) para o fibrinogênio. A epinefrina potencializa o ADP e o Tromboxane A2. O colágeno necessita estar na sua conformação de tripla hélice composta de três cadeias peptídicas e, após interação com o receptor específico de membrana (GPIa/IIa), ocorre mobilização do cálcio para o interior da plaqueta e sua ativação. Doses baixas de ADP ou colágeno, no agregômetro, representam a primeira onda de agregação que é reversível. Com a liberação do ácido araquidônico da membrana celular, forma-se o tromboxane A2 e liberam-se os grânulos plaquetários, com recrutamento de novas plaquetas, inscrevendo-se a segunda onda de agregação que é irreversível. A ristocetina usada nos testes de agregação não é considerada um verdadeiro agonista, pois ela produz aglutinação das plaquetas na presença do fvW e da GPIb da membrana plaquetária (LOURENÇO, 2001; PARISI; SMYTH; COLLIER, 2001).

A citometria de fluxo é uma tecnologia com grande especificidade que analisa, em meio líquido, as propriedades físicas e biológicas das células (NISHIOKA et al.,

2005). A identificação e quantificação celular é realizada pela ligação de anticorpos monoclonais (reagentes) com os determinantes antigênicos na membrana, citoplasma, ou mesmo intracelulares. Esses reagentes estão ligados a uma ou mais substâncias fluorescentes (fluocromos) que ao serem atingidas pelo laser do citômetro emitem luz em diferentes comprimentos de onda, cuja intensidade é quantificada através dos fotomultiplicadores. O sistema mede as fluorescências emitidas, a dispersão da luz e também o volume da célula ou partícula.

A avaliação da função e ativação plaquetária é realizada com auxílio de anticorpos fluorescentes, direcionados contra as glicoproteínas de membrana plaquetária, ligantes a essas proteínas e antígenos expressos após a ativação.

A citometria de fluxo fornece informações eletrônicas, como tamanho, granularidade e presença de antígenos específicos. Esses dados são adquiridos através da passagem de luz em um fluxo constante da suspensão de células ligadas à anticorpos específicos marcados com substância fluorescente (SCHIMITZ; ROTHE; RUF, 1998).

A glicoproteína GPIIb/IIIa é a mais abundante na superfície plaquetária, com cerca de 50.000 cópias por plaqueta e atua como um receptor na interação entre plaquetas ou na ligação das plaquetas com proteínas do subendotélio. A GPIIb/IIIa é constituída por um complexo de polipeptídeos e está presente na membrana plaquetária, megacariócitos, no sistema canalicular aberto e na membrana dos grânulos alfa. A utilização de anticorpo monoclonal CD41 importante para o estudo da agregação, permite que se identifique a GPIIb/IIIa presente na membrana da plaqueta, na forma não ativada (LANDI; MARQUES, 2003). A GPIb também presente nos megacariócitos, e na superfície plaquetária, está relacionada a adesividade, ao FvW e ao subendotélio, identificado pelo CD42b.

A tecnologia de citometria de fluxo para estudo das plaquetas é relativamente recente e tem sido amplamente utilizada em pesquisa, devido ao aumento da disponibilidade dos anticorpos monoclonais comercializados.

Os métodos de agregação induzida por agonistas e a citometria de fluxo serão utilizados neste trabalho para melhor conhecer as alterações das plaquetas na forma hepatoesplênica da esquistossomose e a repercussão da doença na função e morfologia das plaquetas.

2.5. FATOR DE von WILLEBRAND (FvW)

A molécula do fator de von Willebrand é uma grande proteína multimérica, produzida pelos megacariócitos e pelas células endoteliais. Encontra-se nos grânulos alfa das plaquetas secretado após estimulação de agonistas, ligando-se ao complexo glicoprotéico das plaquetas ativadas, atuando na adesão plaquetária.

No plasma o FvW forma um complexo com o fator VIII coagulante (FVIIIc), e a união dos dois aumenta consideravelmente a meia vida plasmática do FVIIIc, protegendo-o da inativação pela proteína C e FX ativado sendo de grande importância na hemostasia (RUGGERI ; WARE, 1993).

No plasma, o FvW e o FVIIIc circulam mantidos por ligações não covalentes, formando complexo, constituído por 99% de FvW e 1% de FVIII (MANNUCCI, 2004) Sua deficiência qualitativa ou quantitativa ocasionam manifestações hemorrágicas. Por outro lado, níveis elevados causam maior risco de formação de trombos. Os grandes multímeros do FvW ,de grande função coagulante, quando secretados pelas células endoteliais são clivados em multímeros de baixo peso molecular com menor função coagulante (MANNUCCI, 2004).

O gene do FvW está localizado no braço curto do cromossoma 12, possui aproximadamente 178kb, sendo constituído por 52 exons, comum em ambos os sexos e seus níveis não modificam com a idade. (CASANA et al., 2001).

O FvW possui subunidades idênticas, com migração eletroforética de 225 kDa. Essas subunidades se interligam para formar multímeros de tamanhos variados chegando até 20.000 KDa (FURLAN; ROBLES; LÄMMLE, 1996).

Na circulação os grandes multímeros, de elevada ação coagulante, sofrem proteólise fisiológica através da metaloprotease presente no plasma, dando origem a moléculas menores com massa entre 500 (dímeros) e 15.000 KDa (FURLAN, 1996).

Na célula endotelial, o FvW sintetizado é secretado para o plasma ou para o subendotélio, fazendo parte da matriz extracelular ou então é estocado nos corpúsculos de Weibel - palade, de onde será liberado por ação da trombina, histamina, stress, serotonina, endotoxina, catecolaminas, estrógeno, diversas citocinas, fibrina, desmopressina ou radicais de oxigênio e componentes do complemento (FURLAN; ROBLES; LÄMMLE, 1996). Em vista a possibilidade de estimulação por estes últimos agentes, o FvW é considerado uma proteína de fase

aguda. O retorno à normalidade da função endotelial é acompanhado de redução dos níveis do fvW, sendo portanto sua atividade antigênica considerada um marcador de disfunção endotelial e assim utilizado em várias doenças (RIBES; FRANCE; WAGNER, 1987).

CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS

3.1. GERAL

Verificar a existência de alteração da morfologia plaquetária, de seus antígenos de superfície, da agregação das plaquetas e da dosagem do antígeno do fator de von Willebrand em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica .

3.2. ESPECÍFICOS

- Estudar a agregação plaquetária induzida por agonistas nos pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica.
- Identificar a existência de alterações morfológicas das plaquetas (presença ou não de macroplaquetas) e dos antígenos específicos da membrana GPIIb/IIIa e GPIb em pacientes com esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica.
- Avaliar alterações quantitativas do antígeno fator de von Willebrand (FvW:Ag).
- Verificar se existe ou não associação significativa entre os níveis do antígeno do fator de von Willebrand com cada uma das variáveis: ocorrência de varizes do esôfago , diâmetro longitudinal do baço, fibrose periportal pela classificação de Cairo e de Niamey e a agregação com Ristocetina.
- Verificar se existe ou não associação significativa entre as faixas do número de plaquetas com cada uma das variáveis: diâmetro longitudinal do baço, fibroses periportal pela classificação de Cairo e de Niamey, agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP, Colágeno, Adrenalina e Ristocetina e níveis do antígeno do Fator de von Willebrand.

CAPÍTULO 4 - MÉTODOS

4.1. PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto de Pesquisa em seres humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE em 19 de maio de 2004, protocolo de Pesquisa n° 070/2003. Para desenvolvê-lo, selecionou-se 45 pacientes do Hospital das Clínicas da UFPE. Todos pacientes envolvidos foram informados, em linguagem acessível, que estavam participando de uma pesquisa clínica (Apêndice 1).

A pesquisa foi realizada no Hospital das Clínicas da UFPE e no Laboratório do HEMOPE.

4.2. CASUÍSTICA

Foram estudados de modo prospectivo 45 pacientes com doença hepática esquistossomótica na forma hepatoesplênica, atendidos nos Ambulatórios de esquistossomose e de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE no período de 2004 a 2006.

O diagnóstico de esquistossomose foi baseado na história clínica, exame físico e ultra-sonografia do abdome com aparelho modelo ALOKA® SSD 500 com transdutor convexo de 3,5 MHz mostrando a fibrose periportal típica da esquistossomose, fibrose de Symmers. Além disso, os pacientes foram submetidos a endoscopia digestiva alta e exames laboratoriais como: hemograma, testes de coagulação, exames bioquímicos e sorológicos para comprovação da esquistossomose de FHE, objetivo específico desse estudo e excluir outras doenças hepáticas e comorbidades. No laboratório do HEMOPE, foram realizados testes para agregação plaquetária, imunofenotipagem por citometria de fluxo com CD41e CD42b e a determinação do Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) pela Técnica de ELISA.

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Só foram incluídos, nesta pesquisa, pacientes portadores de esquistossomose na forma hepatoesplênica, referidos aos Ambulatórios de Esquistossomose e de Hematologia do HC, que não atendiam aos critérios de exclusão.

4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes esquistossomóticos esplenectomizados;
- Uso abusivo de álcool (acima de 60g /dia para homens e 40g/dia para mulheres);
- Diagnóstico clínico, laboratorial ou ultrassonográfico de cirrose Hepática;
- Doenças sistêmicas, tais como:
 - Neuropatias;
 - Hepatite aguda, ou crônica B ou C;
 - Diabetes Mellitus;
 - Cardiopatias;
 - Colagenoses;
 - Hemopatias e outras Hepatopatias;
 - Outras infecções virais ou bacterianas recentes;
 - Uso de fármacos hepatotóxicos;
 - Drogas trombocitopênicas ou que alteram a função plaquetária como antiinflamatórios não hormonais, AAS, inseticidas, antimaláricos;
 - Antecedentes de hemotransfusão, no período de 90 dias anterior à coleta.

4.4.1. Operacionalização e categorização das variáveis

4.4.2. Elenco de variáveis

Quadro 1 - Elenco de Variáveis

Nome da variável	Definição	Categorização
Pancitopenia	Redução no sangue periférico de leucócitos, hemácias e plaquetas	1. SIM 2. NÃO
Bicitopenia	Redução de duas linhagens	1. SIM 2. NÃO
Plaquetopenia isolada	Redução das plaquetas abaixo de 150.000 /mm ³).	1. SIM 2. NÃO
Ausência de citopenias	Não apresenta alterações das 3 linhagens.	1. SIM 2. NÃO
Monocitopenia	Redução isolada da série vermelha ou série branca	1. SIM 2. NÃO
N° de Plaquetas	Contagem de plaquetas	1. <50.000mm ³ 2. 50.000-100.000 mm ³ 3. >100.000-150.000mm ³ 4. Acima de 150.000mm ³
Macroplaquetas	Plaquetas jovens de tamanho aumentado	1. SIM 2. NÃO
Agregação plaquetária com ADP, Ristocetina, colágeno, adrenalina.	Estudo da interação plaqueta – plaqueta, e dos agregados plaquetários <i>in vitro com os 4 agonistas</i> (Born & Hume, 1967).	1. Normoagregante 2. Hipoagregante 3. Ausência de agregação
Anticorpo monoclonal de membrana plaquetária CD41	Identificação de antígenos plaquetários através de anticorpos monoclonais. Identifica o complexo glicoprotéico GPIIb/IIIa, relacionado a agregação plaquetária	1. Normal 2. Diminuído 3. Ausente
Anticorpo monoclonal de membrana plaquetária CD42b	Identificação de antígenos plaquetários através de anticorpos monoclonais. Identifica a glicoproteína GPIb, relacionada a adesão plaquetária.	1. Normal 2. Diminuído 3. Ausente
Grau de Fibrose periportal Classificação de Cairo -1992	Medida dos diâmetros externos de 3 ramos da veia porta intra-hepática após a terceira bifurcação	1. Grau I = >3 -5 mm 2. Grau II = >5 -7 mm 3. Grau III > 7 mm
Grau de Fibrose Classificação de Niamey - 2000	Medida baseada nos padrões qualitativos da fibrose.	1. C-Fibrose periférica 2. D- Fibrose central 3. E - Fibrose avançada 4. F- Fibrose muito avançada
Varizes de esôfago	Dilatação das veias do esôfago	1.SIM 2.NÃO

Tamanho do Baço obtido pelo ultrassom	Observado através do diâmetro longitudinal	1- 12,1 - 15 cm 2- 15,1-20 cm 3. >20 cm
Hemorragia digestiva	Sangramento gastrointestinal	1. SIM 2. NÃO
Antígeno do Fator de von Willebrand	Glicoproteína multimérica que atua na adesão plaquetária e como transportador do FVIIIc (Lopes., Maeda., Bydlowski, 1998)	1. normal 47%-197% 2. elevada >197%-250% 3. muito elevada >250%

4.4.3 Elenco de co-variáveis

Quadro 2 – Elenco de Co-Variáveis

Nome da co-variável Sócio-demográfica	Definição	Categorização
Procedência	Recife e Região Metropolitana / Zona da Mata I / Agreste / Sertão	1 – Região Metropolitana do Recife (RMR); 2 – Zona da mata (ZM) 3 – Agreste; 4 – Sertão.
Gênero	Forma culturalmente elaborada para a diferença sexual.	1 – Masculino; 2 – Feminino.
Faixa etária	Anos de idade completos em 2006. (Barbosa, Gonçalves, Melo, 1995)	1 – < 20anos; 2 –20<40 anos; 3 –40<60 anos; 4- >60 anos

4.5. PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

4.5.1. Instrumentos

Foi aplicado formulário padronizado com antecedentes clínicos e exames complementares comprobatórios da forma hepatoesplênica da esquistossomose compensada, para os pacientes que aceitaram participar da pesquisa. Neste formulário constou maior número de informação, pois esta pesquisa contém subprojetos que darão posteriormente continuidade a este estudo. (Apêndice 2).

4.5.2. Coleta da amostra e execução dos testes

A coleta das amostras foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE, e imediatamente realizada a contagem de plaquetas, através do Coulter Cell Dyn 3000 System Abbott® (São Paulo, SP), além da observação no esfregaço do sangue da morfologia presença ou não de plaquetas jovens (macroplaquetas).

As plaquetas foram contadas e medidas por impedância elétrica ou por dispersão da luz. O contador de células fornece a contagem e a variação do tamanho das plaquetas. Foram considerados níveis normais de plaquetas entre 150.000 a 400.000 mm^3 e como plaquetopenia valores abaixo de 150.000 mm^3 .

Após o consentimento informado, foram coletadas duas amostras de 5ml de cada paciente, evitando estase e contaminação com material tissular, em tubos de polipropileno ou vidro siliconizado, sendo um citratado a 3,8%, em uma proporção de anticoagulante e sangue 1:9, utilizado para dosagem do fator de von Willebrand e separação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para realização da agregação plaquetária. Um segundo tubo com 5ml, contendo EDTA foi utilizado para o hemograma e a citometria de fluxo. Um esfregaço sangüíneo foi feito com uma gota de sangue para, após coloração, proceder-se a análise em microscopia convencional e observação das plaquetas (Apêndice 3).

Nas amostras colhidas que apresentaram plaquetopenia, foi realizada a contagem manual pelo método de Fônio. Também se observou a presença de macroplaquetas, alterações de forma e granularidade, pois os contadores eletrônicos podem confundir plaquetas grandes com hemácias, fornecendo contagens inferiores à verdadeira (BAIN, 2004). Indivíduos com contagem de plaquetas normais, também podem eventualmente apresentar macroplaquetas (plaquetas gigantes) e alterações de forma, etc.

Após a coleta, o material foi enviado ao laboratório para análise, pois a estocagem compromete o resultado.

4.5.3. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária é pH-dependente, portanto o tubo com o PRP foi mantido entre 7,0 e 8,0 de pH, tampados e as provas foram realizadas até no máximo duas horas após a coleta da amostra.

O plasma rico em plaquetas foi preparado por centrifugação da amostra, durante 5 minutos a 1500 rpm.

Transferiu-se cuidadosamente o PRP para um tubo plástico, evitando sua contaminação com hemácias ou leucócitos e mantido tampado, a uma temperatura entre 20-25° C até o momento do teste, permanecendo 30 minutos em repouso para as análises.

O sangue remanescente foi então centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos para obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP).

Em pacientes com plaquetopenia, foi utilizado um controle normal diluído para a mesma quantidade de plaquetas do plasma-teste. Os testes de agregação plaquetária foram realizados no PACKS-4, (Platelet Agregation Chromogenic Kinetic System), agregômetro automatizado da Helena Laboratories,[®] (Beaumont, Texas) registrador dinâmico da agregação plaquetária.

Os agentes agregantes (agonistas) utilizados para pesquisa da função plaquetária foram: ADP Helena Laboratories[®] e Ristocetina da Diagnostica Stago[®] (Asnières, France), na proporção de 400µl para 100 µl de PRP do paciente; e o Colágeno e a Adrenalina da Helena Laboratories[®], na proporção de 450 µl para 50

µl de PRP do paciente. O resultado do teste foi expresso em porcentagem de agregação. (Apêndice 3).

Considera-se 100% a quantidade de luz transmitida pelo plasma pobre em plaquetas (PPP), enquanto que o nível basal de 0% corresponde ao plasma rico em plaquetas (PRP). Foram analisados ainda outros parâmetros, como a presença de uma ou duas ondas e a mínima concentração do agente capaz de induzir agregação. A padronização e a maneira de expressão dos resultados variam de acordo com as normas adotadas no laboratório. Os valores de referência adotados foram: normal $\geq 65\%$ a 95% hipoagregante $<65\%$ a 6% e ausente abaixo de 6% .

As figuras abaixo mostram o resultado das agregações plaquetárias com colágeno (1), ristocetina (2), Epinefrina (Adrenalina) (3) e adenosina difosfato ADP(4), no paciente nº 45, com esquistossomose mansoni na forma hepatoesplênica.

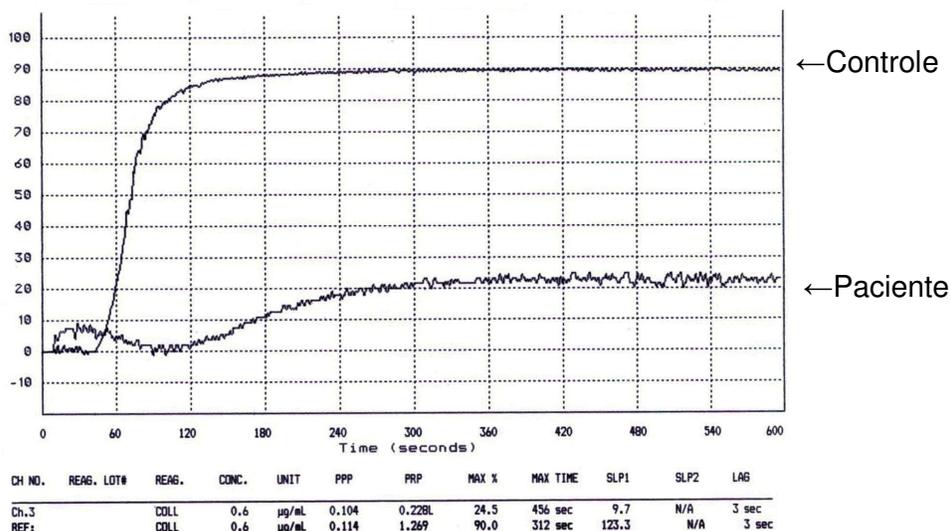


Figura 1 - Curva de agregação com colágeno do paciente número 45 com esquistossomose mansoni FHE

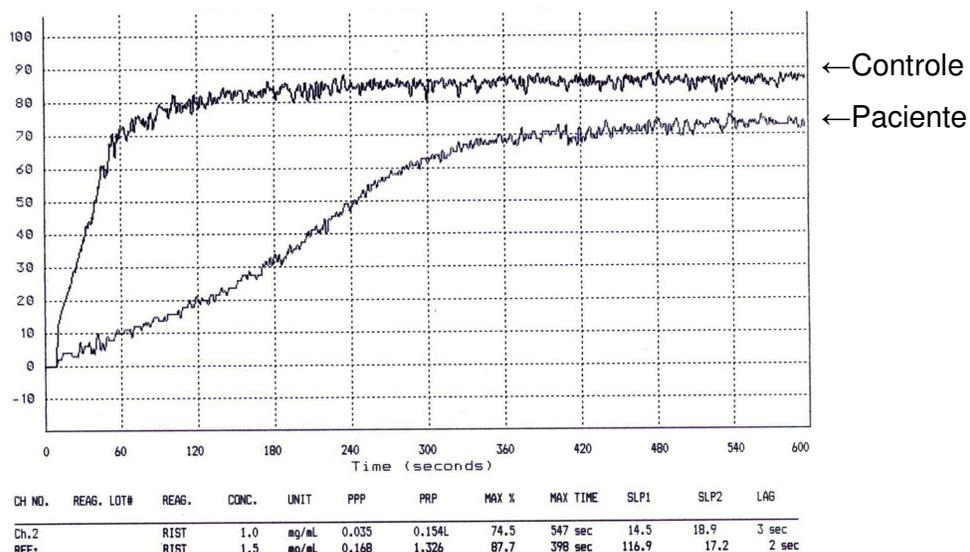


Figura 2 - Curva de agregação com ristocetina do paciente número 45 com esquistossomose mansoni FHE

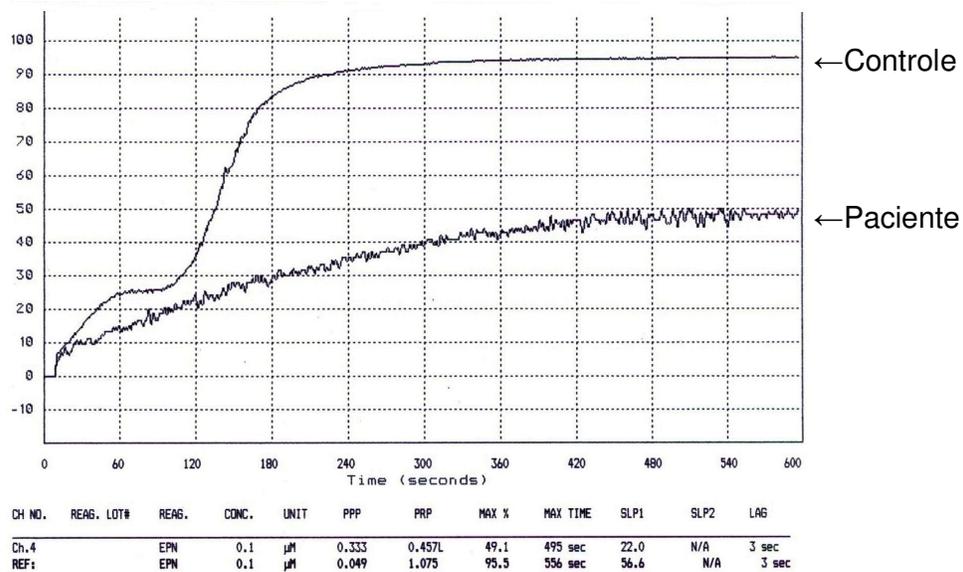


Figura 3 - Curva de agregação com epinefrina do paciente número 45 com esquistossomose mansoni FHE

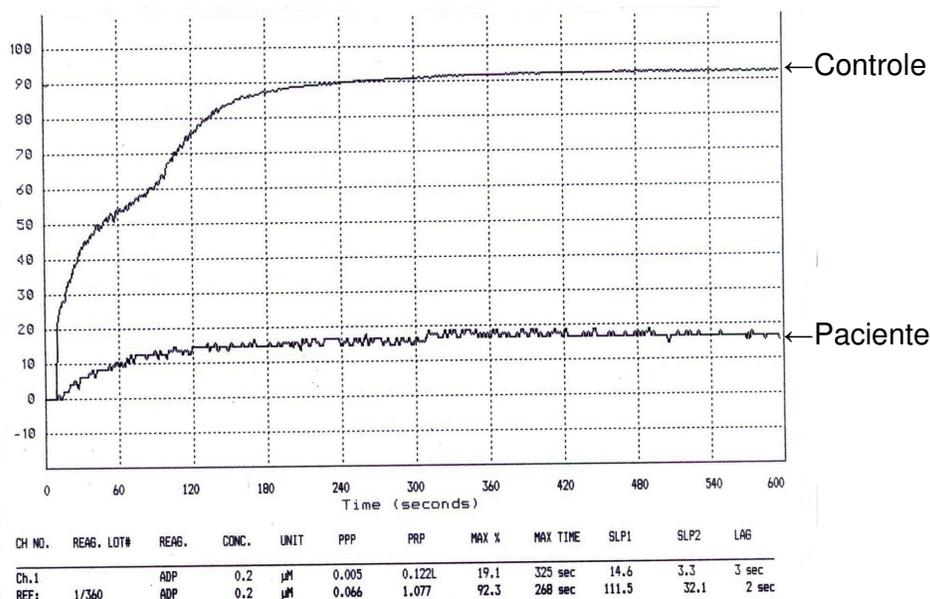


Figura 4 - Curva de agregação plaquetária com ADP com paciente número 45 com esquistossomose mansoni FHE

4.5.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo para avaliação indireta da função plaquetária foi realizada com o auxílio de anticorpos fluorescentes direcionados contra as glicoproteínas de membrana plaquetária, ligantes a essas proteínas e antígenos expressos após ativação (SCHIMITZ; ROTHE; RUF, 1998).

Os anticorpos monoclonais aplicados, utilizando o Citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA), foram: anticorpo monoclonal anti-CD41 FITC (green) PN IMO-649, Clone P2, chain IgG1, species mouse da Immunotech, A Beckman Coulter Company, relacionado aos megacariócitos e ao complexo Glicoprotéico GPIIb/IIIa plaquetário relacionado à agregação. O anti-CD42b FITC (green) da Immunotech A Beckman Coulter Company, PN IMO-648 clone SZ2, chain IgG1, species mouse, relacionado aos megacariócitos, endotélio, FvW e que identifica a GPIb relacionada à adesão das plaquetas (TOMER, 2006). Os reagentes foram mantidos em geladeira à temperatura de 4-8 °C.

Retirou-se uma amostra de 5ml de sangue de cada paciente da pesquisa e do controle, coletado à temperatura ambiente, com EDTA (utilizado para permitir uma boa desagregação das plaquetas), centrifugado durante 6 min em 1000 rotações por minuto (rpm), para obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

Aspirou-se o sobrenadante e, em tubos para o citômetro, distribuiu-se 20 microlitros de PRP + 2 microlitros do anticorpo. Para cada paciente foram colocados 3 tubos: 1ª com o controle, 2ª com o anti-CD 41, 3ª com anti-CD42b. Em seguida, os tubos foram incubados por 30 min no escuro, a temperatura ambiente. Após este período, ressuspendeu-se o material de cada tubo em 1ml de tampão Isoton do próprio fabricante.

Periodicamente, a estabilidade e reprodutibilidade do citômetro foi checada com o kit Calibrite TM beads (BECTON DICKISON). No controle negativo, as plaquetas foram incubadas com anticorpo de camundongo (isotipo controle- imunoglobulina monoclonal mouse IgG 1) conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Foi realizada leitura no aparelho FASC calibur Becton Dickison através do Software Cell Quest . ESCALA LOG (FS; SSC; FL1; FL2), utilizando-se os seguintes parâmetros básicos:

FSC = 363 (tamanho)

SSC = 402 (granularidade)

FL1 = 653 cones de fluorescência

FL2 = 554 cones de fluorescência

O CD41 e o C42b Positivos representaram plaquetas e micropartículas derivadas das plaquetas adquiridas em janela de aquisição (R1), em gráfico FSC x SSC (tamanho x granularidade).

As plaquetas de tamanho normal tiveram valor > 2 fl e as micropartículas <2 fl.

No gráfico de aquisição, foi definido o “Threshold” (limiar) de tamanho com valor de referência > 2 fl para as plaquetas, e <2 fl para as micropartículas. Utilizou-se “beads de calibração” (esferas de calibração) fornecidos pelo fabricante.

A citometria de fluxo ofereceu análise das plaquetas em condições fisiológicas. Nesta análise, as plaquetas, não foram ativadas no processo de centrifugação e manipulação. Além disso, o teste pôde ser realizado em pacientes com plaquetopenia acentuada.

O valor de referência para o CD41(GPIIb/IIIa) foi de 82 a100% e para o CD42b (GPIb) de 76 a 100%,em estudo realizado em doadores do HEMOPE. (Apêndice 3)

Os gráficos a seguir mostraram o resultado da análise dos antígenos CD41e CD42b por citometria de fluxo no paciente número 5 com esquistossomose forma hepatoesplênica.

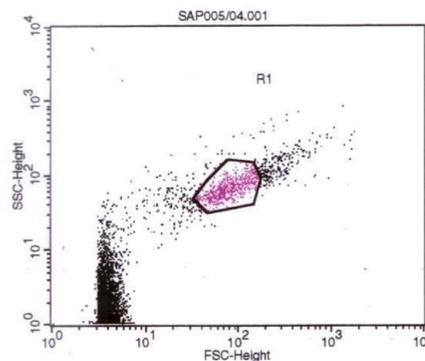


Figura 5 - Gráfico de dispersão das plaquetas por tamanho e complexidade plasmática de FSC X SSC (paciente número 5 com esquistossomose hepatoesplênica).

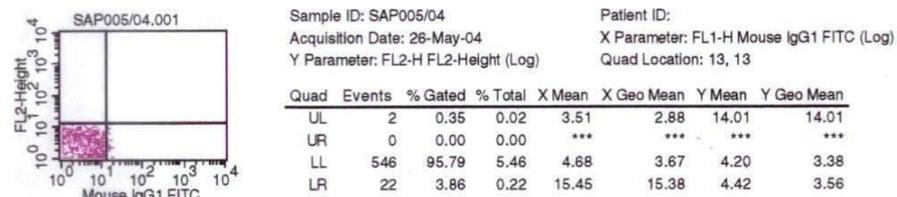


Figura 6 - Gráfico de pontos “Dot Plot” para obtenção do controle negativo.

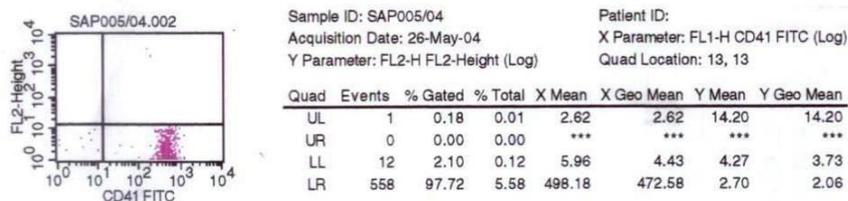


Figura 7 - Gráfico de pontos “Dot Plot” com CD 41 FITC em plaquetas (paciente número 5 com esquistossomose hepatoesplênica).

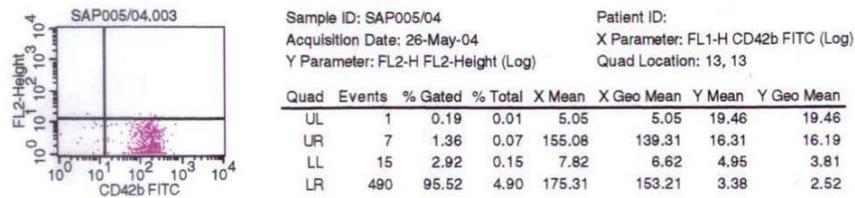


Figura 8 - Gráfico de pontos “Dot Plot” com CD42b FIT C em plaquetas (paciente número 5 com esquistossomose hepatoesplênica).

4.5.5. Fator de von willebrand

A metodologia ELISA (Enzimaimunoensaio) da HELENA LABORATORIES® (Beaumont, Texas) para quantificação do Antígeno do Fator von Willebrand (FvW:Ag) emprega anticorpos monoclonais contra o FvW:Ag para medir a quantidade total do FvW:Ag no plasma. Usada a técnica de captura do Antígeno do Fator von Willebrand humano da amostra de sangue, cujo anticoagulante foi o citrato. Anticorpos específicos para FvW:Ag foram imobilizados nos micropoços de poliestireno, nos quais as amostras dos pacientes e dos controles foram diluídas, aplicadas e incubadas, para permitir a ligação do FvW:Ag disponível com o anticorpo. Os micropoços foram então lavados para remoção das proteínas plasmáticas não ligadas aos anticorpos.

Os FvW:Ag ligados foram quantificados pela adição de um conjugado enzimático, que foi um anticorpo contra o Antígeno do Fator von Willebrand humano ligado à peroxidase. Decorrido o período de incubação, todo o conjugado não ligado foi removido dos micropoços por lavagem. Substrato cromogênico, contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foi adicionado, produzindo reação colorimétrica.

A variação de cor verificada na reação foi medida por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 450 nm e expressa em densidade óptica (DO).

A curva de referência foi plotada em papel logarítmico com valores oriundos do plasma controle de concentração conhecida, a qual serviu de base para a determinação da concentração de antígeno do Fator von Willebrand das amostras.

Foi utilizado pool de doadores do hemocentro HEMOPE, como controle interno normal.

A maioria dos pacientes estudados apresentou valores acima de 197%, fugindo a linearidade da curva de calibração. As amostras foram testadas em várias diluições, sendo o resultado obtido através da média encontrada em todas as testagens. Os valores de referência foram de 47% a 197%.

4.6. TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

ESTUDO PROSPECTIVO DO TIPO SÉRIE DE CASOS (MOSES, 1992) - Este tipo de estudo oferece novo enfoque com profundidade sobre a função plaquetária e do Fator de von Willebrand (FvW) na esquistossomose mansônica na sua forma hepatoesplênica, assim como a associação entre número de plaquetas, FvW, diâmetro longitudinal do baço e varizes de esôfago.

4.6.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, foram obtidas distribuições absolutas e percentuais para as variáveis nominais ou categorizadas e as medidas estatísticas: média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para as variáveis numéricas (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes F (ANOVA), teste t-Student com variâncias iguais e teste Exato de Fisher. Destaca-se que a verificação da hipótese de igualdade de variâncias nos testes t-Student e F (ANOVA) foram realizadas através do teste de Levene e que o teste Exato de Fisher foi utilizado porque as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas. (ALTMAN, 1991; ZAR, 1999).

O nível de significância utilizado para a decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

4.6.2. LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO

Viés de seleção da amostra:

- A amostra com característica diferente da população alvo (inferência comprometida);

- O Hospital das Clínicas HC - UFPE é referência para tratamento da forma hepatoesplênica da esquistossomose ocorrendo a possibilidade de características diferenciadas entre os pacientes como: duração, maior severidade do problema e pacientes mais comprometidos;

- Recusa dos pacientes em participar do estudo.

Viés de aferição da amostra:

- Por dificuldade de aquisição pelos custos elevados dos kits dos anticorpos para estudo dos antígenos de superfície das plaquetas dos pacientes, realizou-se apenas a investigação do GPIb para avaliar adesão e o GPIIb/IIIa para avaliar agregação, e a dosagem do FvW:Ag .

A agregação plaquetária com os quatro agonistas anteriormente descritos foi em parte prejudicada pela contagem de plaquetas reduzidas.

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Foram estudados 45 pacientes com idade média de 52,5 anos, desvio padrão de (11,94%), variando de 22 a 83 anos.

Verificou-se que a maioria dos pacientes (71.1%) estavam na faixa de 40<60 anos, seguido de (20%) da amostra que tinha ≥ 60 anos. Houve maior prevalência do sexo feminino (64,4%). TABELA 1

Tabela 1 - Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica por idade e sexo.

Variável	n	%
• Faixa etária		
< 20	-	-
20 <40	4	8.9
40 < 60	32	71.1
≥ 60	9	20
TOTAL	45	100,0
• Sexo		
Masculino	16	35,6
Feminino	29	64,4
TOTAL	45	100,0

Na distribuição dos pacientes em relação a procedência atual, segundo a naturalidade, verificou-se que 4 pacientes que nasceram na RMR (Região Metropolitana do Recife - periferia urbana) permaneceram na mesma região até a data do exame. Dos 10 pacientes nascidos no Agreste, 6 continuaram residindo na mesma região. Dos 31 pacientes da zona da mata, 11 permaneceram na mesma área endêmica. No total, 21 pacientes (46,6%) continuaram no foco. TABELA 2

Tabela 2 - Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose forma hepatoesplênica por região da procedência atual, segundo a região da naturalidade.

Procedência atual				
Naturalidade	RMR% N	ZM%** N	Agreste%N	Total
RMR*	n 4	-	-	4
Zona da Mata	n 20	11	-	31
Agreste	n 4	-	6	10
Total	n 28 62,2%	n=11 24,4%	n =6 13,3%	n=45 100%

*RMR - Região Metropolitana do Recife

**ZM - Zona da Mata

A seguir, estão relacionados os resultados da análise descritiva da avaliação hematológica, da agregação plaquetária, do antígeno do Fator de von Willebrand, dos anticorpos plaquetários CD41 e CD42b, dos achados ultrassonográficos do abdome superior, presença de varizes de esôfago e de hemorragia digestiva nos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica. As variáveis nominais ou categorizadas foram expressas em número e percentual e as variáveis numéricas foram expressas em média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Da Tabela 3 destaca-se que: apenas dois (4,4%) pacientes não apresentaram citopenia, os dois maiores percentuais corresponderam aos que tinham bicitopenia e pancitopenia com valores iguais a 46,7% e 26,7%, respectivamente, seguido de 15,6% que apresentaram plaquetopenia isolada. A presença de macroplaquetas foi analisada em 42 pacientes e observou-se que ocorreu em 24 (57,1%) dos pacientes.

Tabela 3 - Distribuição dos 45 pacientes, segundo a citopenia e a ocorrência ou não de macroplaquetas.

Citopenia	N	%
Ausencia de citopenia	2	4,4
Leucopenia ou anemia isolada	3	6,7
Bicitopenia	21	46,7
Plaquetopenia	7	15,6
Pancitopenia	12	26,7
TOTAL	45	100,0
Macroplaquetas		
Sim	24	57,1
Não	18	42,9
TOTAL (1)	42	100,0

Na tabela 4 e no gráfico 1 verificou-se que mais de 50% dos pacientes apresentaram diminuição ou ausência de agregação plaquetária. A ristocetina foi a que apresentou maior percentual de agregação normal (47,2%)

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica segundo os testes de agregação plaquetária com Adrenalina, ADP, Ristocetina e Colágeno.

Variável	Agregação Plaquetária							
	Normal		Hipoagregante		Ausente		TOTAL	
	N	%	n	%	N	%	N	%
• Adrenalina ⁽¹⁾	10	27,0	15	40,5	12	32,4	37	100,0
• ADP ⁽¹⁾	5	13,5	23	62,2	9	24,3	37	100,0
• Ristocetina ⁽²⁾	17	47,2	14	38,9	5	13,9	36	100,0
• Colágeno ⁽²⁾	8	22,2	15	41,7	13	36,1	36	100,0

(1) - Para 8 pesquisados o exame não foi realizado.

(2) - Para 9 pesquisados o exame não foi realizado.

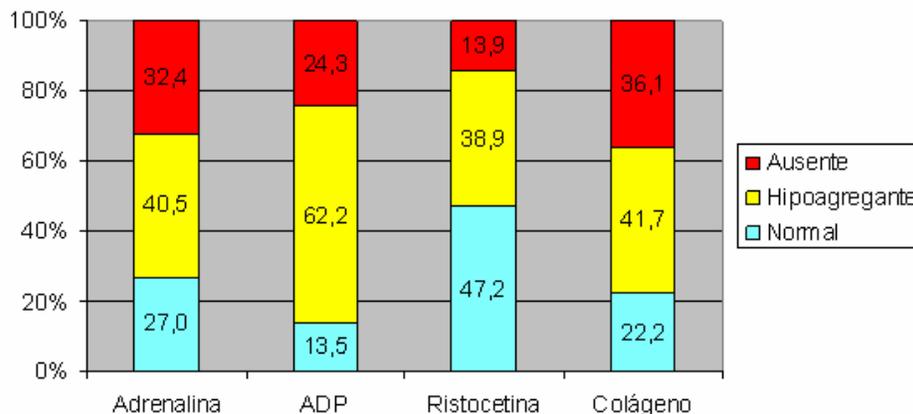


Gráfico 1 - Avaliação da agregação plaquetária nos pacientes com esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica.

Na tabela 5, verificou-se que para 3 pacientes os resultados dos marcadores CD41 e CD42B não foram realizados. Dos outros 42, apenas 4 (9,5%) tinham o CD41 diminuído e 38 (90,5%) tinham a medida normal. Em relação ao CD42B a medida estava diminuída para um (2,4%) paciente e normal para 41 (97,6%).

Tabela 5 - Avaliação dos anticorpos monoclonais CD41 e CD42b em 42 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

Variável	Normal		Diminuído		Total n
	n	%	n	%	
CD41	38	90,5%	4	9,5%	42
CD42 b	41	97,6%	1	2,4%	42

Na Tabela 6, apresenta-se os resultados dos valores médios, desvio padrão, coeficiente de variação do diâmetro longitudinal do baço, número de plaquetas e dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand no qual é possível verificar que a variabilidade expressa através do coeficiente de variação aceitável para número de plaquetas (50,80%) e baixo, para o diâmetro longitudinal do baço (21,34%). Para a dosagem do antígeno do fator de von Willebrand o coeficiente de variação medido foi no máximo igual a (30,69%).

Tabela 6 - Resultados dos valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação do número de plaquetas, diâmetro longitudinal do baço e da dosagem do antígeno do fator von Willebrand nos pacientes estudados com esquistossomose forma hepatoesplênica.

Variável	Estatística				
	Média	D.P. ⁽¹⁾	C.V. ⁽²⁾	Mínimo	Máximo
• Diâmetro logitudinal do baço (cm) (n=45)	16,87	3,60	21,34	12,7	25,0
• Número de plaquetas (n = 45)	77522,22	39382,44	50,80	27000	190000
• Dosagem do Antígeno do fator de von Willebrand (n=34) ⁽³⁾	254,12	77,99	30,69	125	444

(1) – D.P. = Desvio Padrão.

(2) – C.V. = Coeficiente de Variação. Medidas em percentual.

(3) – Onze pacientes não se submeteram ao exame.

Na tabela 7, o diâmetro longitudinal do baço para (42,2%) foi de 12,1 a 15,0 cm, para outros (42,2%) foi de 15,1 a 20 cm e para os (15,6%) restantes foi de mais de 20 cm. Varizes no esôfago foram registradas para a maioria (88,9%) dos pacientes e a presença de hemorragia digestiva ocorreu em (53,3%).

Tabela 7 - Distribuição dos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, segundo diâmetro longitudinal do baço, presença de varizes do esôfago e hemorragia digestiva.

Variável	N	%
• Diâmetro longitudinal do baço		
12,1 a 15 cm	19	42,2
15,1 a 20 cm	19	42,2
>20 cm	7	15,6
TOTAL	45	100,0
• Varizes do esôfago		
Sim	40	88,9
Não	5	11,1
TOTAL	45	100,0
• Hemorragia digestiva		
Sim	24	53,3
Não	21	46,7
TOTAL	45	100,0

A classificação da fibrose periportal está apresentada na Tabela 8. Em relação à Classificação de Cairo (1992), verificou-se que a maioria dos pacientes (67,4%) foram distribuídos no grau II e o restante dividiu-se igualmente entre os graus I e III com (16,3%) cada. Quanto à classificação de Niamey (2000), mais da metade dos pacientes (55,8%) foram catalogados no grau fibrose avançada seguido dos com fibrose central (25,6%) e os 18,6% restantes tinham fibrose muito avançada. Nenhum apresentou-se com fibrose periférica.

Tabela 8 - Distribuição dos 43 pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos, segundo a fibrose periportal de acordo com os sistemas de classificação adotados.

Variável	n	%
• Cairo		
I	7	16,3
II	29	67,4
III	7	16,3
TOTAL⁽¹⁾	43	100,0
• Niamey		
Fibrose periférica	-	-
Fibrose central	11	25,6
Fibrose avançada	24	55,8
Fibrose muito avançada	8	18,6
TOTAL⁽¹⁾	43	100,0

(1) – Para dois pesquisados não se dispõe desta informação.

Conforme resultados apresentados no gráfico 2, de 45 pacientes, 11 não foram submetidos a dosagem do antígeno do fator de von Willebrand. Dentre os 34 que realizaram a dosagem, 10 (29,4%) encontravam-se na faixa de normalidade (47% a 197%), 5 (14,7%) estavam no nível elevado (>197% a 250%) e os 19 restantes (55,9%) tinham nível muito elevado (> 250%).

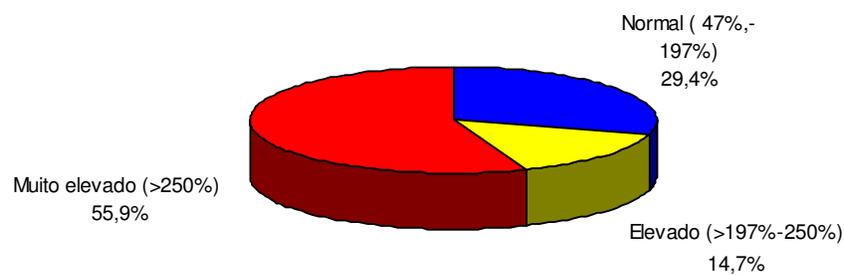


Gráfico 2 - Distribuição dos 34 pacientes esquistossomóticos com a forma hepatoesplênica, segundo a dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand.

5.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Na tabela 9 analisou-se a relação entre o número de plaquetas e o diâmetro longitudinal do baço. Nesta tabela, foi possível observar que: o maior percentual (53,3%) correspondeu aos pacientes que tinham a partir de 50.000 até 100000 plaquetas, seguido dos que tinham abaixo de 50.000 plaquetas (28,9%), (11,1%) tinham mais de 150.000 plaquetas e (6,7%) apresentaram um número de plaquetas de 100.000 a 150.000. Em relação à análise comparativa acima, observou-se percentuais mais elevados para os pacientes com o diâmetro longitudinal do baço de 12,1 a 15 cm e de 15,1 a 20 cm o que correspondeu a uma quantidade entre 50000 a 100000 plaquetas com valores de 52,6% e 68,4% respectivamente. O maior percentual dos pacientes com o diâmetro longitudinal do baço, acima de 20cm, correspondeu aos .pacientes que tinham até 50.000 plaquetas. A associação entre o diâmetro longitudinal do baço e o número de plaquetas mostrou-se significativa a (5,0%) ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Avaliação dos 45 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, quanto ao número de plaquetas segundo o tamanho do baço.

Variável	Número de plaquetas								TOTAL	Valor de p	
	Até 50.000		> 50.000 a 100.000		> 100.000 a 150.000		> 150.000				
	n	%	N	%	n	%	N	%			
• Tamanho do baço											
12,1 a 15 cm	4	21,1	10	52,6	-	-	5	26,3	19	100,0	$p^{(1)} = 0,005^*$
15,1 a 20 cm	3	21,1	13	68,4	2	10,5	-	-	19	100,0	
>20 cm	5	71,4	1	14,3	1	14,3	-	-	7	100,0	
Grupo Total	13	28,9	24	53,3	3	6,7	5	11,1	45	100,0	

(*) – Associação significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste Exato de Fisher.

Conforme resultados apresentados na tabela 10, a média de plaquetas reduziu à medida que o grau da classificação de Cairo ou de Niamey da fibrose aumentou, entretanto não se comprovou diferença significativa entre os graus das classificações ($p > 0,05$). O coeficiente de variação do número de plaquetas com a fibrose periportal grau I e a fibrose do padrão moderado foi também muito elevado. Isso contribuiu para não significância desses resultados. .

Tabela 10 - Avaliação do número de plaquetas, segundo a classificação da fibrose pelo critério do Cairo e de Niamey em 43 pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica.

Variável	Número de plaquetas				
	Média	D.P. ⁽¹⁾	C.V. ⁽²⁾ (%)	Mínimo	Máximo
• Classificação de Cairo					
I (n = 7)	98000,00	60357,27	61,59	27000	190000
II (n = 29)	74293,10	37762,77	50,83	27000	173000
III (n = 7)	69714,29	20564,65	29,50	46000	96000
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,330				
• Classificação de Niamey					
Moderada (n = 11)	90363,64	57715,29	63,87	27000	190000
Avançada (n = 24)	76791,67	35241,99	45,89	35000	173000
Muito avançada (n = 8)	61437,50	17791,33	28,96	46000	94000
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,307				

(1) – D.P. = Desvio Padrão.

(2) – C.V. = Coeficiente de Variação.

(3) – Através do teste F (ANOVA).

Os resultados a seguir relacionaram-se ao estudo analítico com avaliação da dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand, segundo cada uma das variáveis: varizes do esôfago, diâmetro longitudinal do baço, fibrose periportal pela classificação de Cairo e de Niamey, agregação com ristocetina e com o número de plaquetas.

A Tabela 11 mostra que entre os pacientes com varizes de esôfago a maioria foi classificada com nível do antígeno do fator de von Willebrand muito elevado, enquanto entre os 4 pacientes sem varizes do esôfago, três tinham a faixa normal e um tinha a faixa elevada. Comprovou-se associação significativa entre a ocorrência de varizes e a faixa de von Willebrand a (5,0%) ($p < 0,05$). Nos pacientes com diâmetro longitudinal do baço de 12,1 a 15,0 cm, o maior percentual correspondeu aos que tinham nível do antígeno do fator de von Willebrand normal, enquanto entre os que possuíam o diâmetro longitudinal do baço de 15,1 a 20 cm, o maior percentual correspondeu aos classificados com nível do antígeno do fator de von Willebrand muito elevado. Dos 4 com o diâmetro longitudinal do baço superior a 20 cm, dois apresentaram o nível do FvW:Ag elevado e dois o tinham muito elevado e comprovou-se associação significativa entre as duas variáveis em análise. Em relação a fibrose periportal pela classificação de Cairo observou-se que: dos 6 pacientes classificados com grau I, três possuíam nível FvW:Ag normal; dos que apresentaram grau II, a maioria tinha nível do FvW:Ag muito elevado e todos três que exibiam o grau III, expressaram o nível do FvW:Ag muito elevado, entretanto não se comprovou associação significativa a (5,0%) ($p > 0,05$). Em cada categoria da fibrose periportal pela classificação de Niamey, a maioria mostrou o nível do FvW:Ag muito elevado, sendo que para os que apresentaram fibrose muito avançada, todos exibiram o nível do FvW:ag muito elevado, mas sem comprovação de associação significativa ($p > 0,05$). O maior percentual em cada categoria da agregação com ristocetina teve o nível do FvW:Ag muito elevado e não se comprovou associação significativa.

Tabela 11 - Avaliação do nível do Antígeno do Fator de von Willebrand, segundo as variáveis: ocorrência de varizes do esôfago, diâmetro longitudinal do baço, grau de fibrose periportal pela classificação de Cairo e de Niamey e a agregação com ristocetina em 34 pacientes com esquistossomose FHE.

Variável	Nível do antígeno de Fator de von Willebrand								Valor de p	
	Normal				Elevada		Muito elevada			Grupo Total
	n	%	N	%	N	%	N	%		
• Varizes do esôfago										
Sim	7	23,3	4	13,3	19	63,3	30	100,0	$p^{(1)} = 0,034^*$	
Não	3	75,0	1	25,0	-	-	4	100,0		
TOTAL	10	29,4	5	14,7	19	55,9	34	100,0		
• Diâmetro longitudinal do baço										
12,1 a 15 cm	8	53,3	2	13,3	5	33,3	15	100,0	$p^{(1)} = 0,014^*$	
15,1 a 20 cm	2	13,3	1	6,7	12	80,0	15	100,0		
>20 cm	-	-	2	50,0	2	50,0	4	100,0		
TOTAL	10	29,4	5	14,7	19	55,9	34	100,0		
• Fibrose periportal Classificação do Cairo										
I	3	50,0	2	33,3	1	16,7	6	100,0	$p^{(1)} = 0,126$	
II	6	25,0	3	12,5	15	62,5	24	100,0		
III	-	-	-	-	3	100,0	3	100,0		
TOTAL	9	27,3	5	15,2	19	57,6	33	100,0		
• Fibrose periportal Classificação de Niamey										
Fibrose central	2	25,0	2	25,0	4	50,0	8	100,0	$p^{(1)} = 0,557$	
Fibrose avançada	7	33,3	3	14,3	11	52,4	21	100,0		
Fibrose muito avançada	-	-	-	-	4	100,0	4	100,0		
TOTAL	9	27,3	5	15,2	19	57,6	33	100,0		
• Agregação com Ristocetina										
Normal	6	40,0	2	13,3	7	46,7	15	100,0	$p^{(1)} = 0,729$	
Hipoagregante	3	23,1	3	23,1	7	53,8	13	100,0		
Ausente	1	20,0	-	-	4	80,0	5	100,0		
TOTAL	10	30,3	5	15,2	18	54,5	33	100,0		

(*) – Associação significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste Exato de Fisher.

A Tabela 12 mostrou que em 24 pacientes dos 34 casos analisados (70,6%) o nível antigénico do Fator de von Willebrand encontrou-se elevado ou muito elevado. Os casos com FvW:Ag muito elevado ocorreram nos pacientes com maiores plaquetopenias (abaixo de 100.000 mm³), 17/28 pacientes (67,7%).

Tabela 12 - Avaliação do nível do Antígeno do Fator de von Willebrand, segundo número de plaquetas em 34 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica.

Número das plaquetas	Nível do antígeno do Fator de von Willebrand								Valor de p
	Normal		Elevada		Muito elevada		Grupo Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Até 50.000	3	33,3	1	11,1	5	55,6	9	100,0	p⁽¹⁾ = 0,217
>50.000 a 100.000	6	31,6	1	5,3	12	63,2	19	100,0	
>100.000 a 150.000	--	-	2	66,7	1	33,3	3	100,0	
> 150.000	1	33,3	1	33,3	1	33,3	3	100,0	
TOTAL	10	29,4	5	14,7	19	55,9	34	100,0	

(1) - Através do teste Exato de Fisher.

Como na Tabela 12, a subdivisão em 4 grupos de acordo com o número de plaquetas dispersou os resultados, deixando várias categorias com apenas 1 paciente, o que poderia dificultar a análise estatística, resolveu-se fazer nova tabela agrupando-se com apenas 2 grupos de plaquetas: um acima e outro abaixo de 100.000 plaquetas. A Tabela 13, assim realizada, mostrou que houve associação entre o nível de plaquetas e o FvW:Ag.

Tabela 13 - Avaliação do nível do antígeno Fator de von Willebrand, segundo o número de plaquetas acima e abaixo de 100.000 mm³ em 34 pacientes esquistossomóticos FHE.

Níveis de von Willebrand									
Número das plaquetas	Normal		Elevada		Muito elevada		Grupo Total		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Até 100.000	9	32,1	2	7,1	17	60,7	28	100,0	p⁽¹⁾ = 0,035*
> 100.000	1	16,7	3	50,0	2	33,3	6	100,0	
TOTAL	10	29,4	5	14,7	19	55,9	34	100,0	

(*) – Associação significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste Exato de Fisher.

CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Embora o número de pacientes acompanhados no ambulatório de esquistossomose mansoni seja grande (em média 2 pacientes novos por semana), este trabalho envolveu apenas 45 casos, devido ao rigoroso critério de exclusão (seleção), assim como o período determinado para a coleta de dados e exames laboratoriais.

Foram então selecionados pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, sem antecedentes de esplenectomia ou qualquer comorbidade.

A média geral de idade acima de 50 anos (52,5 anos), Desvio Padrão (11,94) com limites mínimo e máximo, respectivamente, de 22 a 83 anos, está de acordo com os trabalhos realizados nos últimos 10 anos em nossa região (PEREIRA et al., 1998; FERRAZ et al., 2001; MAIA, 2002), e isso é um reflexo das campanhas de tratamento específico em massa para esquistossomose, realizado nos últimos 30 anos (BINA, 1992; COUTINHO; DOMINGUES, 1993; BARBOSA; GONÇALVES; MELO, 1995). Antes dos programas de controle de esquistossomose mansoni realizados pelo Ministério da Saúde a partir de 1978, a maior prevalência da forma hepatoesplênica ocorria na faixa etária entre 20-30 anos (ANDRADE.; BINA, 1983; CURY, 1989; PRATA, 2004). Vale lembrar que este estudo foi realizado em pacientes maiores de 18 anos, pois o ambulatório de esquistossomose mansoni tem como perfil o atendimento ao paciente adulto.

A predominância no sexo feminino de 64% nesta casuística, também coincide com a de outros trabalhos na mesma região endêmica em nível hospitalar (BARBOSA; GONÇALVES; MELO, 1995; SILVEIRA; SILVEIRA; KELNER, 1995; FERRAZ et al., 1999), talvez pelo fato das mulheres procurarem mais assistência médica em hospitais. Entretanto, estudos feitos em áreas endêmicas rurais mostram predomínio da esquistossomose forma hepatoesplênica em indivíduos do sexo masculino, pois estes, devido a atividades de lazer e/ou profissionais, apresentam contato mais precoce com águas infestadas pelo parasita, desenvolvendo maior carga parasitária antes dos 15 anos, período em que não se desenvolveu ainda a

imunidade protetora (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; SILVEIRA; SILVEIRA; KELNER, 1997). Segundo Prata (1992), 5 a 10% da população de áreas endêmicas sofrem reinfecções sucessivas e desenvolvem a FHE, por um defeito da imunidade protetora.

Grande parte dos pacientes da presente casuística (46,6%) continuaram morando no foco original da parasitose, o que pode favorecer a reinfecção neste grupo (PRATA, 1992).

O grupo estudado na presente casuística corresponde a pacientes com forma hepatoesplênica mais avançada. Cinquenta e sete vírgula oitenta e oito por cento, apresentavam baço muito aumentado de tamanho (diâmetro longitudinal), (88,9%) dos pacientes apresentavam varizes de esôfago e (53,3%) relataram episódio de hemorragia digestiva (TABELA 7). Esses resultados sugerem um maior grau de hipertensão porta neste grupo. Observou-se também nesta casuística que houve predomínio de casos com fibrose avançada e muito avançada (74,4%) o que foi também observado em trabalhos recentes realizados no estado de Pernambuco (MACIEL, 2006). TABELA 8

6.2. METODOLOGIA

A escolha dos testes para verificação da função plaquetária tais como agregação plaquetária e o estudo de alguns dos antígenos de superfície através dos anticorpos CD41 e CD 42b por citologia de fluxo assim como a dosagem do fator de von Willebrand pela técnica de ELISA, foram realizados nos laboratórios de coagulação e de citometria de fluxo do HEMOPE, por serem exames muito específicos e por ter esta Instituição equipamentos apropriados para realização desses exames. O hemograma através da contagem eletrônica Cell Dyn 3000 System Abbott® e análise morfológica das plaquetas foi realizada no Hospital das Clínicas.

Existem poucos estudos envolvendo estes testes na esquistossomose forma hepatoesplênica e não se encontrou referências na literatura com a dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand nesta forma clínica.

A dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand pelo método de ELISA foi acrescido ao estudo, porque em vários trabalhos com doença cirrótica observou-se aumento do antígeno do fator de von Willebrand.

O diâmetro longitudinal do baço foi categorizado através de uma modificação da classificação ultrassonográfica feita por Morali; Blendes, (1991).

A categorização das plaquetas em 4 faixas foi estabelecida pelo maior risco de sangramento nos pacientes com plaquetas abaixo de 50.000 e entre 50.000 a 100.000.

As quatro categorias utilizadas para idade foram baseadas nos estudos de Barbosa; Gonçalves; Melo (1995).

6.3. COMENTÁRIOS DOS RESULTADOS

6.3.1. Citopenias

Apenas 2 pacientes (4,4%) não tinham citopenia, o que mostra que os pacientes na forma mais avançada da doença, com maior grau de fibrose e hipertensão porta, normalmente apresentam redução das células do sangue, apenas cinco pacientes (11,1%) apresentaram contagem de plaquetas normais e estes resultados estão de acordo com a literatura revisada (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; MAIA, 2002). A maior parte dos pacientes tinham bicitopenia com maior frequência a associação de plaquetopenia e leucopenia, fato já referido por alguns autores (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; MAIA, 2002; CARVALHO; JESUS, 2003; PETRIANU; OLIVEIRA; ALBERTI, 2004)

A média do número de plaquetas foi 77.522, mostrando que a maioria dos pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose apresenta plaquetas abaixo de 100.000 mm³. Na esquistossomose mansônica, a contagem de plaquetas também tem sido um importante indicador de gravidade de doença por aumentar o risco de sangramento, sendo sua redução numérica observada por alguns autores como relacionada à presença de hipertensão portal (SOUSA et al., 2000).

6.3.2. Macroplaquetas

Foram encontradas macroplaquetas em 24 (57,1%) dos indivíduos da amostra analisada. Isso indica que a presença de plaquetas mais jovens na circulação desses pacientes deve-se a ocorrência de uma boa resposta da medula óssea, porém não o suficiente para corrigir a diminuição causada pela esplenomegalia. Petroianu; Oliveira; Alberti, (2004), observaram que a redução das células sanguíneas poderia ocorrer também pelo represamento destas células no baço, causada pela dificuldade na drenagem sanguínea porta. Nakamura et al., (1998), também relataram retenção de plaquetas nos espaços sinusoidais do fígado, em pacientes com fibrose hepática. Não encontrou-se relação significativa entre o número de plaquetas, dosagem do FvW:Ag e a presença de macroplaquetas.

6.3.3. Avaliação da agregação plaquetária

Observou-se uma predominância de pacientes com hipoagregação ou ausência de agregação. Tal achado provavelmente ocorreu pelo número de plaquetas reduzido nestes pacientes (cifras de plaquetas menores de 100.000 por mm³). O maior percentual de normalidade observado foi com a ristocetina (47.2%), por ser uma substância com maior capacidade de aglutinação do que de agregação. Os agonistas ADP e Colágeno foram os que apresentaram maior percentual de deficiência nos testes de agregação (Tabela 4) e (Gráfico 2).

Estudos envolvendo agregação com ADP e colágeno realizados em pacientes com doença hepática não esquistossomótica, apresentaram alterações semelhantes as quais também foram atribuídas, possivelmente, ao número reduzido de plaquetas (KELLY; TUDDENHAM, 1986)

6.3.4. Citometria de fluxo – Quantificação do CD41 e do CD42b

Os anticorpos monoclonais estudados pela citometria de fluxo foram o CD42b, que reflete indiretamente a adesão plaquetária através da GPIIb, e o CD41, que reflete indiretamente a agregação plaquetária através das GPIIb/IIIa. A quantificação destas glicoproteínas de membrana foram normais em mais de 90%

dos pacientes. Esses achados comprovam não existir alterações numéricas destas glicoproteínas (GP) de membrana plaquetária GPIb e GPIIb/IIIa em pacientes com esquistossomose mansoni na forma hepatoesplênica que possam induzir maior seqüestro esplênico.

Soares, (2005) analisou, por citometria de fluxo, a ativação plaquetária através do CD62P (P selectina-marcador de ativação plaquetária) de 18 pacientes com esquistossomose, dos quais apenas três eram da forma hepatoesplênica e demonstrou existir um estado de pré-ativação plaquetária nos pacientes portadores de esquistossomose mansônica, independente da presença ou grau de fibrose hepática. Por outro lado, estudos com marcadores de GP plaquetária, realizados em pacientes cirróticos, mostraram alterações da GPIb (BEER et al., 2004; LISMAN, et al., 2006). Esses resultados sugerem que na esquistossomose mansoni FHE, por não existir, provavelmente, alteração de membrana plaquetária, o mecanismo da plaquetopenia seja mais por retenção das plaquetas no baço, como foi descrito por Petroianu; Oliveira; Alberti, (2004), do que por seqüestro e destruição esplênica. Este último mecanismo, possivelmente, será bem mais ativo em pacientes cirróticos.

6.3.5. Antígeno do fator de von Willebrand

A dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand dos 34 pacientes esquistossomóticos com forma hepatoesplênica (Gráfico 2), mostrou resultados elevados a muito elevados, na maioria dos pacientes estudados (70,6%). Provavelmente, esses resultados estão relacionados à lesão ativa do endotélio vascular, provocada pela hipertensão porta. Estudos realizados, em cirróticos, mostraram o FvWAg também elevado, provavelmente secundário à disfunção endotelial desencadeada pela endotoxemia (LISMAN; LEEBEEK; GROOT, 2002).

Na hipertensão arterial pulmonar, a disfunção endotelial secundária leva à secreção de grandes quantidades do FvW:Ag, porém com atividade biológica reduzida pelo desaparecimento dos grandes multímeros, mediados por enzimas liberadas pelos leucócitos (CARAMURÚ et al., 2003).

Estudos realizados em caramujos *Lymnaea stagnalis* infectados com schistosoma aviário *Trichobilharzia ocellata* demonstraram aparecimento em grande quantidade, durante parasitismo do molusco, de uma proteína denominada Granularin, semelhante ao FvW que teria função de opsonização com melhora do sistema de defesa do caramujo (SMIT et al., 2004).

6.3.6. Análise comparativa das variáveis estudadas

Houve associação inversa significativa entre a variável, número de plaquetas e o diâmetro longitudinal do baço medido pelo ultra-som. Observou-se que quanto menor o número de plaquetas, maior o diâmetro do baço nos pacientes esquistossomóticos com a forma hepatoesplênica, demonstrando ser a retenção das células do sangue, no baço, o principal mecanismo da plaquetopenia, como já foi mencionado anteriormente. Maia (2002) também verificou relação do número de plaquetas com o tamanho do baço, entretanto ele tentou explicar o achado pelo maior seqüestro e destruição das células pelo baço, TABELA 9. Por outro lado, Petroianu; Oliveira; Alberti, (2004), em seus estudos, sugeriram que a redução das células sangüíneas eram conseqüentes ao represamento destas células por dificuldade na drenagem sangüínea porta, e não oriundas do hiperesplenismo no seu sentido clássico, pois com a preservação do baço, após anastomose esplenorenal ou nos casos de esplenectomia subtotal, ocorria normalização das células sangüíneas no hemograma. Esta explicação está mais de acordo com achados deste trabalho.

Observou-se diminuição do número de plaquetas à medida que aumentava o grau de fibrose pelas 2 classificações (Cairo (1992) e Niamey (2000)). Esses resultados não foram significantes, talvez pela maior concentração de pacientes com grau II de fibrose, classificação de Cairo, e fibrose avançada, pela classificação de Niamey. Possivelmente, com maior número de pacientes, esses resultados seriam significantes TABELA 10.

Na tabela 11, o presente estudo mostrou relação significativa ($p < 0,05$) entre a presença elevada do antígeno do Fator de von Willebrand com aumento do diâmetro longitudinal do baço e do FvW:Ag com a presença de varizes de esôfago, variáveis relacionadas ao maior grau de hipertensão porta.

Na Tabela 12, observou-se que a maioria dos pacientes estudados apresentaram aumento do FvW:Ag (70,6%) e que houve uma alta concentração das maiores elevações do FvW:Ag com menor número de plaquetas. Esses resultados não foram significantes. Quando se condensou a análise com 2 faixas do nível de plaquetas (acima e abaixo de 100.000), relacionando-as ao FvW:Ag, os resultados foram significantes. Como o FvW é produzido pelas células do endotélio vascular e megacariócitos, portanto secretado pelas plaquetas e endotélio, há uma relação entre diminuição das plaquetas com grau de hipertensão porta, provavelmente, essa elevação do FvW:Ag, nos casos com menores cifras de plaquetas, deva-se a maior produção e liberação desse fator pelas células endoteliais. Isso poderia explicar, como mecanismo de proteção, a ausência de sangramentos cutâneo mucoso em pacientes com plaquetas baixas e de “trombose” em pacientes com plaquetas elevadas.

6.3.7. Considerações finais

Analisando os resultados, conclui-se que os níveis plasmáticos elevados do FvW:Ag (proteína considerada de fase aguda), provavelmente ocorreram por disfunção do endotélio vascular provocada pela hipertensão porta. É possível, então explicar várias alterações clínicas e laboratoriais que se encontram no seguimento de pacientes esquistossomóticos na FHE:

- 1 - O achado de contagens normais de plaquetas, em torno de 25% dos casos, em pacientes esquistossomóticos com esplenomegalia, deve-se, possivelmente, a uma “ausência” de hipertensão porta acentuada, ocorrendo compensação pela medula óssea;
- 2 - A ausência de sintomatologia decorrente da plaquetopenia como petéquias, equimoses, gengivorragia e outros, no paciente esquistossomótico FHE, deve-se, provavelmente, ao aumento do FvW:Ag que ajudaria na estabilização dos microagregados de plaquetas impedindo esses pequenos sangramentos (Jimenez et al., 2005), assim como a integridade dos antígenos de membrana plaquetária podem também contribuir na redução destas manifestações. No entanto, esses mecanismos de defesa não são suficientes para impedir os grandes sangramentos como os desencadeados pela ruptura das varizes do esôfago. No cirrótico, com os mesmos

níveis de plaquetas, apesar destes pacientes apresentarem o FvW:Ag elevado, desenvolvem sangramentos decorrentes da plaquetopenia por disfunção plaquetária e alteração da coagulação;

3 - A não correção da plaquetopenia com uso de heparina no esquistossomótico, deve-se, não a um consumo crônico, e sim, a sua retenção no baço (STEIN; HARKER, 1986). O uso desse anticoagulante, por agir nos microagregados de plaquetas rico em FvW, poderia desencadear sangramentos. Em um pequeno número de cirróticos, com coagulopatia de consumo crônica, há relatos do uso de heparina;

4 - Raros casos de esquistossomose, com doença muito avançada, intensa fibrose periportal, fígado diminuído de volume e hipertensão porta acentuada, a grande elevação do FvW pode aumentar o risco de trombose. Isso explica os 4 a 6% dos pacientes esquistossomóticos com esplenomegalia que evoluem com trombose da veia porta e a também elevada frequência de trombose portal pós esplenectomia.

Conclui-se, finalmente, baseado neste estudo e na revisão de literatura, que na esquistossomose FHE ocorre:

A - Redução do número de plaquetas por retenção das mesmas no baço e não por seqüestro e excesso de destruição;

B - A função de ativação das plaquetas parece alterada na maioria dos pacientes esquistossomóticos, devido, a existência de estado de pré-ativação das plaquetas observado pelo aumento da expressão do anti-CD62P (P-selectina), observado pela citometria de fluxo, independente do grau de lesão hepática (SOARES, 2005). A P-selectina é considerada indicador de granularidade e secreção plaquetária (MICHELSON, 1996). Soares, (2005) observou, em seus estudos, que a dosagem do PDGF-AB (fator de crescimento derivado das plaquetas com cadeias polipeptídicas de transcrição simultânea A e B) foi elevada nos pacientes com esquistossomose e isso poderia estimular de forma mais intensa a proliferação das células hepáticas que sintetizam a fibrose;

C - A elevação do FvW:Ag e os valores numericamente normais do CD 42b, encontrados neste trabalho, parecem manter a adesão plaquetária estável;

D - A agregação, também parece está normal quando ligada ao fibrinogênio, assim como, a expressão das GPIIb/IIIa pelos resultados obtidos com o CD41;

E - Os testes de agregação plaquetária, induzidos pelos agonistas (ADP; colágeno; ristocetina e adrenalina) e realizados pelo agregômetro PACKS, mostraram-se alterados nos pacientes com esquistossomose porque, apesar da grande especificidade, são dependentes de um número de plaquetas normal.

CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES

Neste estudo para determinação da função plaquetária e a dosagem do FvW:Ag encontrou-se nos 45 pacientes analisados os seguintes resultados:

1 - A maioria dos pacientes apresentou níveis baixos de plaquetas (abaixo de 100.000);

2 - A agregação das plaquetas induzida por agonistas foi diminuída ou ausente na maioria dos pacientes;

3 - Não houve alteração numérica avaliada pela citometria de fluxo dos anticorpos monoclonais CD41 e CD42b para os antígenos de membrana das plaquetas;

4 - Ocorreu associação inversa significativa entre o número de plaquetas e o diâmetro longitudinal do baço;

5 - O FvW:Ag estava elevado ou muito elevado na maioria dos pacientes (70,6%);

6 - Houve associação entre elevação do FvW:Ag com o diâmetro longitudinal do baço e a presença de varizes de esôfago;

7 - A maioria dos pacientes com FvW:Ag muito elevado 17/28 (67,7%) apresentou plaquetas abaixo de 100.000mm^3 . Houve associação inversa significativa entre a elevação do FvW:Ag e a contagem de plaquetas abaixo ou acima de $100.000/\text{mm}^3$.

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS

ALTMAN, D. G. - **Practical Statistics for medical Research**. Great Britain London, 1991.

AMARAL, A. C. C.; AGUIAR, L.A. K.; SOUZA, M. R. A.; TOLEDO, C. F. E.; BORGES, D. R. - Elevação da γ - Glutamitransferase Sérica na Hepatopatia Esquistossomótica não se correlaciona com a carga parasitária e precede alterações ultra-sonográficas. **Arquivos gastroenterologia**, 39 (1): 27-31, 2002.

AMITRANO, L.; GUARDASCIONE, M. A.; BRANCACCIO, V.; BALZANO, A.- Coagulation Disorders in Liver Disease. **Seminars in Liver Disease**,. 22(1): 83-96, 2002.

ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. - A patologia da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica em sua forma avançada (estudo de 232 necrópsias completas). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 78(3): 285-305, 1983.

ASFORA, J.; DOMINGUES. A. L. C.; COUTINHO, A. D. - Clínica e Bioquímica do Sangue em Esquistossomótico. **JBM**. 35: 58-73. 1978.

BAIN, B. J. - **Células Sangüíneas. Um Guia Prático**. Artmed, 3 ed., Porto Alegre. 2004. p.126-130.

BAGSHAW, A. - A comparative Study of hypersplenism in reactive and congestive splenomegaly. **Br. J. Haematol**. 19:729-737, 1979.

BARBOSA, F. S.; GONÇALVES, J. F.; MELO, M. C. V. - Formas hepatoesplênicas da esquistossomose mansônica no interior do nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pub**. 11:325-331, 1995.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. - Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Rev. Saúde Pul.**, 30(6):609-616, 1996.

BAWDLER, A.J. - Splenomegaly and hiperplenism. **Clinics in Haematology**. 12(2):467-487, 1983.

BEER, J. H.; CLERICE, N.; BAILLOD, P.; VON, FELTEN, A.; SCHLAPPRITZI, E.; BUCHI, L. - Quantitative and qualitative analysis of platelet GPIb and von Willebrand Factor in liver cirrosis. **Thromb. Haemost.**, 73(4):601-609, 1998.

BENNET, J. S. - The molecular biology of platelet membrane proteins. **Blood**, 27:186, 2004.

BINA, J. C. - O tratamento específico como arma no controle da esquistossomose. **Men. Inst. Oswaldo Cruz.**, 87, Suppl. IV.195-202. 1992.

BORN, G. V. R.; HUME, M. - Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma. **Nature.**; 215: 1027 -1029, 1967.

BRANDT, C. T.; ARAÚJO, L. B.; BARBOSA, M. C. - Autotransplantation of spleen tissue in children with mansonic schistosomiasis who underwent splenectomy:evaluation of splenic residual functions. **Acta Cir. Bras.**, 13(4):212-216, 1998.

BRANDT, C. T.; ARAÚJO, A. R. L.; DIAS, M. H. D.; SANTOS, M. E. Coagulação e fibrinólise em esquistossomóticos submetidos a esplenectomia, ligadura de veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico. **An. Fac. Méd. UFPE**, 48(1): 25-29. 2003.

BRASS, L. F.; HOXIE, J. A.; MANING, D. R. - Signaling through G proteins and Gprotein-coupled receptors during platelet activation. **Throm. Haemost.**, 70 (1): 217-223, 1993.

BRUBARKER, L. H.; JOHNSON, C. A. - Correlation of splenomegaly and abnormal neutrophil pooling margination. **J. Lab Clin. Méd**, 92 (4): 508-518, 1978.

BUTTERWORTH, A. E. - Studies of human schistosomiasis: chemotherapy, immunity and morbidity. **Ann. Parasitol Hum. Comp**, 65:53-57, 1990.

CAIRO WORKRFING GROUP - The use of diagnostic ultrasound in shistosomiasis-attempts at standardization of methodology. **Acta Tropical**, 51:45-63, 1992.

CARAMURÚ, L. H.; SOARES, R. P. S.; MAEDA, N. Y; LOPES, A. A - Hypoxia and Altered Platelet Behavior Influence von Willebrand Factor multimeric Composition in Secondary Pulmonary Hypertension. **Clin. Appl. Throm. Hemost.**, 9(3):t1-t8, 2003.

CARREIRO, J. R. P.; DOMINGUES, L. A. W.; SILVEIRA, M.; LIMA, F. J. R. C.; KELNER, S - Removal of *Schistosoma mansoni* in patients with hepatosplenic schistosomiasis: an estimate of the parasitological load by means of quantitative coproscopy. **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, 25:2-15, 1983.

CARVALHO, E. M., JESUS, A. R. - Baço nas Doenças Parasitárias, In: Petroianu, A. - **O Baço**, São Paulo, 117-126, 2003.

CASANA, P.; MARTINEZ, .F.; HAYA, S.; TAVARES, A.; AZMAR, J. A. - New mutations in exon 28 of the von Willebrand factor gene detected in patients with different types of von Willebrand's disease. **Haematologica**. 86:414-419, 2001.

COUTINHO, A.; LIRA, A. - Alguns aspectos do hiperesplenismo na esquistossomose mansônica. **An. Fac. Med.** Universidade do Recife, 16(2) 245-252, 1956.

COUTINHO, A. D.; DOMINGUES, A. L. C. - Esquistossomose mansoni. In: Dani R; Castro LP **Gastroenterologia Clínica**, 3 ed Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1697-1728, 1993.

CURY, A. A. - Esquistossomose - Contribuições à história natural. **Rev. Col. Bras. Cir**, 16(3):117-120, 1989.

DITTRICH, S.; MATTOS, A. A.; CHENQUE, R. H.; ARAÚJO, F. B. - Correlação entre a contagem de plaquetas no sangue e o gradiente de pressão venosa hepática em pacientes cirróticos. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, 42(1): 35-40, 2005.

DOMINGUES, A.L.C.; DOMINGUES, L.A.W. - Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: Malta J. **Esquistossomose mansônica**. Recife ed. Universitária. UFPE, 1994. p. 91-109.

DOMINGUES, A.L.C. - **Ultra-sonografia na esquistossomose mansônica hepato-esplênica: Avaliação da intensidade da fibrose periportal e da hipertensão porta** - Recife, 1998. - Tese Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde.

DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T. - Esquistossomose Hepática. In: **Conferência de Hepatologia**. São Paulo: Fundo editorial Byk, 391-405, 2001.

EICHNER, E. R. - Splenic function: normal, too much and too little. **Am. J. Méd**, 66(2): 311-320, 1979.

FERRAZ, A. A. B.; BACELAR, T. S.; SILVEIRA, M. J. C.; COELHO, A. R. B.; CAMARA NETO, R. D.; ARAÚJO Jr, J. G. C.; FERRAZ, E. M. - Tratamento cirúrgico da hipertensão portal esquistossomótica no HC/UFPE - Análise de 131 casos. **Rev. Col. Bras. Cir**, 27(5):332-337, 1999.

FERRAZ, A. A. B.; LOPES, E. P. A.; ARAÚJO, J. R.; J. G. C.; LIMA, B. A.; CANTERELLI, F.; FERRAZ, E. M. - Peso do baço como fator prognóstico do tratamento cirúrgicos de pacientes portadores de esquistossomose mansônica, **Rev. Col. Bras. Cir**. 29(1):29-35, 2001.

FERREIRA, H. S.; COUTINHO, E. M. - Should nutrition be considered as a supplementary measure in shistosomiasis control? **An. Trop. Med. Parasitol**. 93(5):437-47, 1999.

FROJMORIC, M. M.; PANJWANI, I. - Geometry of normal mammalian platelet by quantitative microscopic studies. **Biophysical Journal**, 16:1071-1089, 1976.

FURLAN, M. - von Willebrand factor; molecular size and functional activity. **Ann. Hematol**. 72:341-348, 1996.

FURLAN, M.; ROBLES, R.; LÄMMLE, B. - Partial purification and Characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. **Blood**. 87:4223-4234, 1996.

GUERRA, C. C. C.; HADDAD, C. M.; MATSUMOTO, M.; LUZZI, J. R.; SILVA, M. P.; CHACON, J. P. - Comportamento do hiperesplenismo após anastomose esplenorrenal seletiva. **Rev. Assoc. Méd. Bras**. 31:65-70, 1985.

HUSSEIN, M. A.; LEE, E. J.; SCHIFFER, C. A. - Platelet transfusions administered to patients with splenomegaly. **Transfusion**. 30:508-510, 1990.

JIMENEZ, W. J. Y. J. J.; MAURO, L. M.; HORSTMAN, L. L.; CHENG.; AHN, R. E.; BIDOT, C. J.; AHN, Y. S. - Endotelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand Factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation, **J. Throm. Haemost.**,3: 1301-1308, 2005.

JOIST, J. H. - Hemostatic Abnormalities in Liver Disease. In: COLMAN, R. W. et al. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**. 3^a Ed. Philadelphia. 1994, p.906 -920.

JOSEPH, M.; AURIAULT, C.; CAPRON, A.; VORNG, H.; VIEN, P. - A new function for platelets: IgE-dependent Killing of schistosomes. **Nature**, 303: 810-812, 1983.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. - Esquistossomose, xistose, barriga d' água. **Cienc. Cout.** 55(1):38-43, 2003.

KELLY, D. A.; TUDDENHAM, E. G. - Hemostatic problems in liver disease. **Gut**, 27: 339-349. 1986.

KELLY, D. A.; SUMMERFIELD, J. F. - Etiologia Esquistossomose mansônica. In: Malta J **Esquistossomose mansônica**. Recife, Ed. Universitária UFPE, 1994, p. 25-40.

KOIKE, Y.; YONEYAMA, A.; SHIRAI, J.; ISHIDA, T.; SHODA, E.; MIYAZAKI, K.; SUNAGA, S.; HORIE, R.; AOKI, K.; KOIKE, K.; OGATA, I.; TAHARA, T.; KATO, T.; NAKAHARA, K. - Evaluation of Thrombopoiesis in Thrombocytopenic Disorders by Simultaneous Measurement of Reticulated Platelets of Whole Blood and Serum Thrombopoietin Concentrations. **Thromb. Haemost.**, 79:1106-1110, 1998.

LANDI, E.P.; MARQUES Jr, J.F.C. - Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**; 25(1): São José do Rio Preto, 2003.

LEE, R.G.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N.; *Wintrobe Hematologia Clínica*. In: *Wintrobe*, Manole Ltda, 1998; 9^a ed., p. 1367-8

LIMA, G. M. T. - **Contribuição ao estudo da coagulação sanguínea em pacientes portadores da forma hepatoesplênica da Esquistossomose**

mansônica através da tromboelastografia. Recife, 1996. p.58,- Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

LISMAN, T.; LEEBEEK, F. W. G.; GROOT, P. G. - Haemostatic abnormalities in patients with liver disease.**J. Hepatology**, 37:280-287, 2002.

LISMAN, T.; BONGERS, T. N.; ADELMEIJER, J.; JANSSEN, H. L.; DE MAAT, M. P.; GROOT, P. G.; LEEBEEK, F. W. G. - Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity.**Hepatology**, 44(1):53-6, 2006.

LOPES, A. A. B.; MAEDA, N. Y.; BYDLOWSKI, P. S.- Fator de von Willebrand e Disfunção Endotelial Pulmonar. Implicações Prognósticas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.70(3):141-145, 1998.

LOURENÇO, D. M. - Avaliação Laboratorial da Hemostasia. In: Zago M. A, Falcão, R. P, Pasquini, R. - **Hematologia Fundamentos e Prática**, Atheneu, São Paulo, 2001, p.749-755.

LWAMBO, N. J. S.; SIZA, J. E.; BROOKE, S.; BUNDY, A. P.; GUYATT, H. - Patterns of concurrent hookworm infection and schistosomiasis in schoolchildren in Tanzania. **Trans. R. S. Trop. Méd. Hyg.** 93: 497-502, 1999.

MACIEL, R. C. R. - **Enzimas canaliculares na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni.** Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em medicina Clínica) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. p.95.

MAIA, M. D. - **Hiperesplenismo na Esquistossomose mansônica. O Baço e as células sanguíneas antes e depois da esplenectomia.** Recife, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J.F., (1994) – Etiologia. In: Malta J - **Esquistossomose mansônica.** Recife. 1994; Ed. Universitária. UFPE. p.25-40.

MANNUCCI, P. M. Treatment of von Willebrand's Disease,. **N. Engl J Med.** 351 p.683-694, 2004.

METCALF, D. -Trombopoetina- at last. **Nature**, 369, 519-529, 1994.

MICHELSON, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood**, v. 87(12): 4825-4835, 1996.

MORALI, G. A.; BLENDIS, L. M. - **Splenomegaly** IN: OKUDA, K & BENHAMOU J. P. Portal Hypertension: Causes and Effects. 85-99, 1991.

MOSES, L. E. - **The Series of Consecutives Case as a Device for Assessing Outcomes of Interventions.** In: Bailar III, J. C, Mosteller, F.- Medical Uses of Statistics. 2 Ed, cap 7. 1992.

MOTA, L. P; GOMES, R. O.; MACAMBIRA, R. P.; MIRANDA, B. O.; VIEIRA, M. C. G. - Esquistossomose mansoni. **JBM**, 66 (3): 113-119, 1994.

NAKAMURA, M; SHIBAZAKI, M; NITTA, Y; ENDO, Y. - translocation of platelets into Disse spaces and their entry into hepatocytes in response to liposaccharides interleukin -1 and tumour necrosis factor: the role of Kupffer cells. **J. of Hepatology**, 28:991 -999, 1998.

NIAMEY WORKFING GROUP - Ultrasound in shistoso-ultrasonograpy for the assestement of shistosomiasis-related morbidity. **World Health Organization/TDR/ultrason/ documente**, Geneva, Switzerland, 2000.

NISHIOKA, T.; YAMANE, T.;TAKUBO, T.; OHTA, K; PARK, K; HINO, M. - Detection of various platelet - associated Immunoglobulins by flow cytometry in Idiopathic Thrombocitopenic Púrpura. **InterScience**, 68:37-42, 2000.

OMS – Prevencion y control de la esquistosomiasis y las geohelminthiasis.Informe de un Comité de Expertos de la OMS.Série de Informes Técnicos, Ginebra,912,2005.

PANASIUK, A.; ZAK, J.; KASPRZYCKA, E.; JANICKA, K.; PROKOPOWICZ, D. - Blood platelet and monocyte activations and relation to stages of liver cirrhosis. **World J. Gastroenterol.** 11(18): 2754 -2758, 2005.

PÁRAMO, J. A.; ROCHA, E - Hemostasis in Advanced Liver Disease. **Sem. Throm. Hemost.** ,19 (3): 184-190, 1993.

PARISE, L.V.; SMYTH, S.S.; COLLIER, B.S. - **Platelet morphology, biochemistry, and function.** In: Blutler, E; Lichtman, M.A.; Collier, B.S.; Kipps, T.J.; Seligsohn, U. - Williams Hematology. 6 Ed. Cap.111, 2001.

PEREIRA, G. - Esquistossomose mansônica em Pernambuco. Considerações epidemiológicas. **Arq. Bras. Med.** 60(5):357-60, 1986.

PEREIRA, G.; SANTOS, R. P.; ALEXANDRE NETO, J.; AZEVEDO, A. P.; CAVALHEIRA, A. E. - Formas graves da esquistossomose mansônica: Dados de internação hospitalar em Pernambuco. **An. Fac. Med. UFPE.** 38(2):12-18, 1993.

PEREIRA, G.; TÁVORA, M. E. G. Epidemiologia. In: Malta, J. **Esquistossomose mansônica.** Recife, Ed. Universitária da UFPE, 1994; p. 43-58.

PEREIRA, L. M. M. B.; DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T.; MCFARLANE, I. G. - Ultrasonography of the liver and spleen in Brazilian patients with hepatosplenic schistosomiasis and cirrhosis. **Trans.R.S.Trop.Med. Hyg.** 92:639-642, 1998.

PETROIANU, A.; OLIVEIRA, A.E.; ALBERTI, L.R. - "Hiperesplenismo" em hipertensão porta por esquistossomose mansônica. **Rev. Bras. Hematol hemoter.** 26(3):195-201, 2004.

PRANKERD, T.A.J. - The spleen and anemia. **B. Med. J.** 517-524, 1963.

PRATA, A. - Fatores determinantes das formas anatomo-clínicas e evolução da doença. In: Castro L. P, Rocha P. R. S, Cunha, A. S - **Tópicos em Gastroenterologia.** Rio de Janeiro, Medsi. 1991: p. 03-12.

PRATA, A. - The role of the scientific research in the control of schistosomiasis in endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** suppl I. Rio de Janeiro, 99: 5-11. 2004.

PUOL - MOIX, N. In: **Trombocitopenia** Mosby, Madrid. 1995: p.32-40.

RASO, P; PEDROSO, E. R. P. Esquistossomose mansoni. In: Bogliolo **Patologia.** Guanabara. 1987, p. 1055.

RIBES, J. A.; FRANCES, C. W.; WAGNER, D. D. - Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. **J. Clin. Invest.** v.79: p.117-123., 1987.

ROSS, A. G. P.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LY, Y.; Williams, G. M.; McManus, D. P. Current concepts: Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, 346(16) April 18, p.1212-1122, 2002.

RUGGERI, Z. M. - von Willebrand factor. **J. Clin. Invest.** 499-559, 1997.

SCHIMITZ, G.; ROTHE, G.; RUF, A. - European working Group on Clinical cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. **Thromb. haemost.** 79: 885-896, 1998.

SIESS, W. - Molecular mechanisms of platelet activation. **Physiological Reviews**, 69(i):158-179, 1989.

SILVA, L.C.; CHIEFFI, P.P.; CARRILHO, F.J. - Schistosomiasis mansoni-clinical features. **Gastrenterol Hepatology**, vol.28 (1), p.30-39, 2004.

SILVEIRA, R. K.; SILVEIRA, M.; KELNER, S. - Prevalência de sexo raça e grupo etário entre portadores de esquistossomose hepatoesplênica. **An. Fac. Med. UFPE**. 40(1): 48-55., 1995.

SMIT, A.B.; DE JONG-BRINK, M.; LI, K.W.; SASSEN, M.M.; SPIJKER, S.; VAN ELK, R.; BUIJS, S.; VAN MINNEN, J.; VAN KESTEREN, R.E.- Granularin, a novel molluscan opsonin comprising a single vWF type C domain is up-regulated during parasitisation. **FASEB j.** 1-18, 2004.

SOARES, S. - **Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Minas Gerais. 2005.

SOUZA, M. R.; TOLEDO, C. F.; BORGES, D. R. - Thrombocytopenia as a Predictor of Portal Hypertension in Schistosomiasis. **Dig. Dis. and Sci.**; 45(10): 1964-1970, 2000.

SOUZA, M. R. A.; AGUIAR, L. A. K.; GOTO, J. M.; CARVENTE, C. T.; TOLEDO, C. F.; BORGES, D. R. - Thrombopoietin serum levels do not correlate with thrombocytopenia in hepatic schistosomiasis. **Liver**. 22: 127-129, 2002.

SOUZA, M.R.A.; BORDIN, J. O.; BORGES, D. R. - Hiperesplenismo, IN: Petroianu, A. - **O Baço**, São Paulo, p.161-164, 2003.

STEIN, S.; HARKER, L. A. - Kinetic and functional studies of platelets, fibrinogen, and plasminogen in patients with hepatic cirrhosis. **J. Lab. Clin Med.** 99: 217, 1986.

STRAUSS, E. - Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. **Ann Hepatol** 1:06-11, 2002.

TOMER, A - Flow cytometry for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. **Curr. Hematol. Rep.** 5, 64-69, 2006.

THOMAS, D. P.; REAM, V.J.; STUART, R. K. - Platelet aggregation in patients with Laënnec's cirrhosis of the liver. **N. Engl. J. Med.** 276, 1967.

THOMPSON, C. B.; JAKUBOWSKI, J. A.; QUINN, P. G.; DEYKIN, D.; VALER, I C. R. - platelet size and age determine platelet function independently. **Blood.** 63 1372-1375, 1984.

VAN THIEL, D.; GEORGE, M.; MINDIKOGLU, A. L.; BALUCH, M. H.; DHILLO, S. - Review .Coagulation and fibrinolysis in individuals with advanced liver disease. **Turk J. Gastroenterol.** 15(2)67-72, 2004.

WYSZOMIRSKA, R. M. A. F.; NISHIMURA, N. F.; ALMEIDA, S. R. S.; YAMANAKA, A.; SOARES, E. C. - High serum laminin and type IV collagen levels in schistosome miasis mansoni. **Arq. Gastroenterol.**, 42(4):221-225, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4 Ed. Prattice Hall. New Jersey. USA. 1999; p. 929.

Normas adotadas: Esta tese seguiu as normas estabelecidas pela ABNT ano 2002.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário (a) da pesquisa e pelo responsável).

Resolução n°196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde.

Eu _____
_____, tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo sobre as plaquetas na esquistossomose, recebi da Dra. Maria da Conceição de Barros Correia, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- 1) Que o estudo se destina a uma pesquisa sobre as plaquetas na esquistossomose.
- 2) Que a importância deste estudo é a de melhor entender o funcionamento das plaquetas na esquistossomose e da coagulação do sangue.
- 3) Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: saber as alterações plaquetárias através de exames mais específicos.
- 4) Esta pesquisa poderá ou não trazer benefícios a sua pessoa no momento e no entanto ajudará futuros pacientes com plaquetas baixas e esquistossomose, que se submeterão a cirurgias evitando um maior risco de sangramento.
- 5) Que esse estudo começará em 2004 e terminará em 2005
- 6) Que esse estudo será feito da seguinte maneira: será retirada apenas uma amostra de sangue para exame (cerca de 5 ml = 1 colher de sobremesa) com material descartável da mesma maneira que se colhe sangue para hemograma, o que não acarreta nenhum dano, pois é um exame comum, coleta-se sangue do braço onde raramente pode acontecer, no local da punção, uma mancha roxa devido um extravasamento do sangue, que será espontaneamente absorvido, sem outros danos à minha saúde física e mental.
- 7) Que eu participarei apenas da coleta de 5 ml de sangue que não sentirei incômodos não terei nenhum dano à minha saúde mental e física.

8) Que contarei com a assistência da Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues e Dra Maria da Conceição de Barros Correia, sendo os responsáveis pela pesquisa FONE: 32718534 e 34543524.

9) Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: descrição detalhada da função plaquetária e conseqüentemente uma melhor compreensão das alterações e sua importância na esquistossomose.

10) Que eu sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

11) Que poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer prejuízo ou penalidade.

12) Que as informações conseguidas através de minha participação não permitirão identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

ENDEREÇO DO (A) PARTICIPANTE-VOLUNTÁRIO (A)

Domicílio: _____

Complemento: _____ Bairro: _____

CEP: _____ - _____ Cidade: _____ Estado (UF): _____ FONE: _____

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

Instituição: HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFPE

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

Telefone para contato: 21263725 / 21263524 / 21268534

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE.

Centro de Ciências da Saúde 3º andar UFPE – CDU – RECIFE - PE

FONE: 21268538

Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário(a) ou responsável legal
(rubricar as demais páginas)

Assinatura do responsável pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

Testemunha 1.

Testemunha 2.

APÊNDICE 2 – FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
AMBULATÓRIOS DE GASTROENTEROLOGIA E DE HEMATOLOGIA

Nome: _____ Registro: _____
Idade: _____ Sexo: _____ Estado: Civil: _____ Cor: _____
Grau de Instrução: _____ Profissão: _____
Procedência: _____ Naturalidade: _____
Nacionalidade: _____ Residência: _____

Há quanto tempo: _____ Fone: _____

Antecedentes:

1- Banho de rio, contato com água de alagados com areia: () sim () não

Local: _____ Duração: _____ Último contato: _____

2- Doenças Sistêmicas, tais como: Nefropatias, Diabetes mellitus, Cardiopatias, Colagenoses, Hemopatias e outras Hepatopatias: _____

3- H.D.A: Hematêmese: () sim () não; Melena: () sim () não

4- Alcoolismo: () sim () não Quantidade: _____ Freqüência: _____

Duração: _____ Tipo de bebida: _____

5- Tabagismo () sim () não

6- Hemotransfusão: () sim () não Quando: _____

7- Medicações injetáveis: () sim () não Qual(s): _____

8- Uso de drogas: () sim () não Qual(s): _____

9- Vida sexual nos últimos 05 anos: _____

10- Uso de drogas trombocitopênicas (AAS, Antiinflamatório não hormonal, antibióticos, analgésicos, antipertensivos, vasodilatadores) () sim () não Qual(s): _____

11- Outros medicamentos: _____

12- Tratamento de esquistossomose prévio: () sim () não Qual(s): _____

13- Esclerose de varizes esofagianas: () sim () não Nº: _____ Quanto tempo: _____

14- Ligadura elástica de varizes esofagianas: () sim () não Nº: _____ Quanto tempo: _____

15- Viroses: sarampo, rubéola, dengue, caxumba, varicela, hepatite no último ano.

Exames realizados:

1. Hemograma c/ contagem de plaquetas;
2. Ferritina Sérica;
3. TP / INR;
4. TTPA;
5. Fibrinogênio;
6. Transaminases;
7. Gama GT;
8. Fosfatase Alcalina;
9. Bilirrubinas;
10. Crioglobulinas;
11. Eletroforese de Proteínas;
12. HBSAg / Anti – HBC;
13. Anti – HCV;
14. Ultra-sonografia: Grau de Fibrose Periportal;
 - Tamanho do lobo esquerdo;
 - Tamanho do lobo direito;
 - Tamanho do baço e diâmetro longitudinal;
 - Diâmetro de veia porta;
 - Diâmetro veia esplênica;
 - Circulação colateral;
 - Vesícula biliar: espessamento da parede.;

15. Endoscopia Digestiva alta - Varizes Esofagianas (grau, local);
 - Gastropatia.

APÊNDICE 3 - FICHA DE COLETA DE EXAMES - HEMOPE

Prontuário N°:

DATA DA COLETA: ____/____/____

PACIENTE: _____ N° _____

ENDEREÇO: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ TELEFONE: _____

LABORATÓRIO DE COAGULAÇÃO

ESTUDO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

	ADP	RISTOCETINA	COLÁGENO	ADRENALINA
LOTE N°				
HORA				
VALIDADE				
RESULTADO				

LABORATÓRIO DE IMUNOFENOTIPAGEM

	LOTE	VALIDADE	DATA	RESULTADO
CD41				
CD42B				

CONTAGEM DE PLAQUETAS:

MORFOLOGIA PLAQUETÁRIA:

MACROPLAQUETAS:

DOSAGEM DO FvW:



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 208/2004-CEP/CCS

Recife, 21 de maio de 2004.

Ref. Protocolo de Pesquisa nº070/2003-CEP/CCS intitulado " Comportamento das plaquetas na doença hepática esquistossomótica ."

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE analisou, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 19 de maio de 2004.

Ressaltamos que ao pesquisador responsável deverá apresentar relatório, em 30/05/2006

Atenciosamente,

Prof. Geraldo Bezerra Lindoso Couto
Vice - Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa - CCS / UFPE

**À PROFª MARIA DA CONCEIÇÃO DE BARROS CORREIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: (81) 2126. 8588; cepccs@ufpe.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

070/03

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (versão outubro '99)

1. Projeto de Pesquisa: <i>Comportamento dos plaquetas no fibrinólise hepática equinostomias</i>			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) <i>401 Medicina</i>	3. Código: <i>401</i>	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4) <i>D</i>	
5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso) <i>Avaliação do CEP sempre I</i>	6. Código(s): <i>9</i>	7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV ()	
8. Unitermos: (3 opções) <i>Plaquetas Equinostomias Agregação plaquetária</i>			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos No Centro: Total: <i>50</i>	10. Grupos Especiais: <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião/Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros <input checked="" type="checkbox"/> Não se aplica ()		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: <i>Márcia de Almeida de Barros Lima</i>			
12. Identidade: <i>999678</i>	13. CPF: <i>328528724-04</i>	19. Endereço (Rua, n.º): <i>Av. Dom Virgênio</i>	22. U.F.: <i>PE</i>
14. Nacionalidade: <i>Brasileira</i>	15. Profissão: <i>Medicina</i>	20. CEP: <i>53030-000</i>	21. Cidade: <i>Recife</i>
16. Maior Titulação: <i>Mestrado</i>	17. Cargo: <i>Docente</i>	23. Fone: <i>5462 4829</i>	24. Fax:
18. Instituição a que pertence: <i>UFPE</i>		25. Email: <i>cbm@conepa.ig.upe.br</i>	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar, os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: <i>15/04/03</i>			
Assinatura <i>Márcia de Barros Lima</i>			
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: <i>Hospital das Clínicas da UFPE</i>	29. Endereço (Rua, n.º): <i>Av. Prof. Moraes Rêgo s/n (P.U.) - BF 3º andar</i>		
27. Unidade/Orgão: <i>Amb. Hematologia e Equinostomias</i>	30. CEP:	31. Cidade:	32. U.F.:
28. Participação Estrangeira: Sim () Não ()	33. Fone:	34. Fax:	
35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não () Nacional () Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução			
Nome: <i>MARCELO SALAZAR</i>		Cargo: <i>DIRETOR TÉCNICO</i>	
Data: <i>21/05/04</i>		Assinatura: <i>Prof. Marcelo Salazar</i> <i>Dir. Técnico - HC</i> <i>UFPE</i>	
PATROCINADOR Não se aplica ()			
36. Nome:	39. Endereço:		
37. Responsável:	40. CEP:	41. Cidade:	42. U.F.:
38. Cargo/Função:	43. Fone:	44. Fax:	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP			
45. Data de Entrada: <i>15/04/2003</i>	46. Registro no CEP: <i>07062003CEP/PC</i>	47. Conclusão: Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Data: <i>19/05/2004</i>	48. Não Aprovado () Data:
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: Data: <i>30/03/2006</i>			
Encaminhado a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação () 52. Data:		53. Coordenador Nome: <i>Qualquer</i> Assinatura: Vice - Coordenador do Comitê de	Anexar o parecer consubstanciado
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP			
54. Nº Expediente:	56. Data Recebimento:	57. Registro na CONEP:	
55. Processo:			
58. Observações:			