

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Daniele Silva de Moraes Van-Lume

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE C, NA
ESQUISTOSSOMOSE E NA COMORBIDADE**

Recife
2013

Daniele Silva de Moraes Van-Lume

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE C, NA
ESQUISTOSSOMOSE E NA COMORBIDADE**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Orientadores:

Dr^a. Silvia Maria Lucena Montenegro – CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a. Clarice Neuenschwander Lins de Morais – CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes – HC/UFPE

Recife

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

V217a Van-Lume, Daniele Silva de Moraes.
Avaliação de células T regulatórias na
hepatite C, na esquistossomose e na
comorbidade / Daniele Silva de Moraes Van-
Lume. - Recife: s.n, 2013.
157 p. : ilus., graf., tab.

Tese (doutorado em saúde pública) -
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Silvia Maria Lucena
Montenegro, Clarice Neuenschwander Lins de
Morais, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

1. Hepatite C - imunologia. 2. Hepatite C -
patologia. 3. Esquistossomose - imunologia. 4.
Esquistossomose - patologia. 5. Comorbidade.
6. Linfócitos T Reguladores – virologia. 7.
Linfócitos T Reguladores – parasitologia. 8.
Linfócitos T Reguladores – patologia. I.
Montenegro, Sílvia Maria Lucena. II. Morais,
Clarice Neuenschwander Lins de. III. Lopes,
Edmundo Pessoa de Almeida. IV. Título.

CDU 616.36-002

Daniele Silva de Moraes Van-Lume

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE C, NA
ESQUISTOSSOMOSE E NA COMORBIDADE**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

Banca Examinadora

Dr^a Silvia Maria Lucena Montenegro
Dept^o de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ - Orientadora

Dr^a Virgínia Maria Barros de Lorena
Dept^o de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ – Membro avaliador externo

Dr^a Ana Lúcia Coutinho Domingues
Dept^o de Gastroenterologia - HC/UFPE – Membro avaliador externo

Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Dept^o de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ – Membro avaliador externo

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Dept^o de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ – Membro avaliador interno

Dedico esta conquista aos meus pais Lourival e Nadja, pelo amor incondicional e pela educação que me deram. Sem dúvida, são a minha base e o motivo de eu ter chegado até aqui.

Aos meus orientadores, em especial à Silvia pela amizade nos momentos de dificuldade, pela consideração e pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais.

Ao meu eterno mestre Dr. Frederico Abath (*in memoriam*), pelo exemplo de pesquisador e por ter me feito perceber a grandiosidade da ciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela realização deste sonho de infância.

Aos meus pais Lourival e Nadja, pelo amor dedicado a mim todos esses anos e por terem sempre apoiado a minha escolha.

Aos meus queridos orientadores Silvia, Clarice e Edmundo, que sem eles, esse trabalho não seria possível. Muito obrigada.

À Dr^a Ana Lúcia Coutinho, novamente ao Dr. Edmundo Lopes e aos residentes no Hospital das Clínicas da UFPE, em especial Lílian, Viviane e Danielle, pela valiosa ajuda na seleção dos pacientes deste projeto. Cabe também aqui um agradecimento a Liana, por ter me ajudado a selecionar os pacientes com a comorbidade.

A Dr^a Fátima Militão, pela ajuda imprescindível na orientação do meu primeiro artigo da tese. Um agradecimento também a Dr^a Zulma e a Dr. Sinval pelo mesmo motivo.

Aos meus professores do curso de Doutorado, que foram fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

Ao Alexandre, que participou desta pesquisa como aluno de iniciação científica, e que muito me auxiliou neste projeto. Sem dúvida, aprendemos muito juntos.

A Dr^a Maria Carolina, minha amiga Nina, que foi fundamental numa das etapas metodológicas deste projeto. Obrigada pela amizade, paciência e colaboração.

A Dr^a Valéria, por gentilmente ter me cedido o espaço no laboratório da Imunogenética para que eu pudesse realizar meus experimentos. Obrigada pela amizade e confiança.

A todos os colaboradores deste trabalho, em especial a Dr. Marcus Batista e Dr. Valdir Balbino pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus queridos amigos Marina e Romero, pelos momentos terapia e sessões de cappuccino, sushis, risos e ciência.

Obrigada aos meus colegas do laboratório de Imunogenética, em especial Thays e Amanda pela amizade, risos e conselhos.

Ao Rafael, pelo auxílio nas análises estatísticas iniciais e pela ajuda fundamental na elaboração de diversos trabalhos de congresso relacionados ao tema da tese. Obrigada pela amizade, carinho e esforço para entender o que era FOXP3.

Ao professor Paulo Miranda por ter permitido meu estágio em docência na disciplina pela qual tenho verdadeira paixão: Imunologia.

Aos meus colegas de classe do doutorado, que dividimos muitas alegrias, angústias e esperanças. Andréia Barros, a gente conseguiu!

A todos meus amigos que torceram e me apoiaram nesta etapa tão importante da minha vida, em especial a Andréa Moraes, Ludmila Fernandes, Andréa Rangel, Carol Córdula, Deivid Herculano e Thiago Príncipe.

Às instituições CAPES e CNPq, por terem concedido a bolsa de doutorado e o financiamento do projeto, respectivamente, sendo fundamentais na concretização do mesmo.

A todos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães que colaboraram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

Obrigada!!!

“Talento é acertar um alvo que ninguém acerta.
Genialidade é acertar um alvo que ninguém vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A hepatite C e a esquistossomose são graves problemas de saúde pública no Brasil. Quando essas doenças estão associadas na comorbidade (CM), a fibrose evolui mais rapidamente para cirrose. As células T regulatórias (T reg) são produzidas em presença de estímulo antigênico e identificadas por marcadores de superfície (CD4⁺, CD25⁺) e intracelular (FOXP3⁺) e pela produção de citocinas IL-10 e TGF-β. Ainda, estão associadas à proteção do tecido hepático contra danos causados pela resposta imune celular efetora contra o *hepatitis C virus* (HCV) e *Schistosoma mansoni*. Portanto, o objetivo foi avaliar o perfil de células T reg periféricas naturais (nTreg), induzidas (iTreg) e totais em pacientes com esquistossomose (n=22), com hepatite C (n=25) e com a comorbidade (n=14). O percentual dessas células foi obtido por citometria de fluxo. Níveis de IL-10 e TGF-β foram dosados por ELISA e a expressão gênica de FOXP3 foi verificada por qPCR (Δ Ct comparativo). Houve maior percentual de nTreg, iTreg e de T reg total no grupo com esquistossomose comparado ao CM ($p = 0,036$; $0,037$ e $0,023$, respectivamente). Também houve diferença entre o percentual de nTreg nos grupos esquistossomose e hepatite C ($p = 0,006$). Ao associar estes resultados ao grau de fibrose nos grupos hepatite C e CM, não houve diferença. Os percentuais de iTreg ($p = 0,026$) e totais ($p = 0,040$) foram maiores no grupo esquistossomose em relação ao CM quando associados ao padrão D de fibrose. Nos padrões E/F houve diferença no percentual de nTreg ($p = 0,046$) e T reg totais ($p = 0,044$), sendo maior também no grupo esquistossomose. A IL-10 manteve-se elevada nos grupos infectados por *S. mansoni* ($p = 0,023$). Os grupos hepatite C ($p = 0,001$) e CM ($p = 0,048$) apresentaram níveis elevados de TGF-β em relação ao grupo esquistossomótico. A expressão gênica de FOXP3 foi maior 4,27 e 4,89 vezes nos grupos hepatite C e esquistossomose que na CM. Conclui-se que o grupo com esquistossomose apresentou maior percentual de células T reg, produção elevada de IL-10 e baixos níveis de TGF-β em relação aos grupos hepatite C e CM. Isto sugere que o maior percentual de T reg observado em doenças com menor morbidade está relacionado a um efeito protetor contra danos causados ao tecido hepático.

Palavras chave: Hepatite C; esquistossomose; comorbidade; células T regulatórias; imunopatologia.

VAN-LUME, Daniele Silva de Moraes. **Evaluation of regulatory T cells in hepatitis C, in schistosomiasis and in comorbidity.** Thesis (Doctorate in Public Health) - Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2013.

ABSTRACT

Hepatitis C and schistosomiasis are serious public health problems in Brazil. When these diseases are associated in comorbidity (CM), the fibrosis can progress more quickly to cirrhosis. T regulatory cells (T reg) are produced in presence of antigenic stimulation and identified by surface (CD4⁺, CD25⁺) and intracellular (FOXP3⁺) markers and production of cytokines IL-10 and TGF- β . Furthermore, they are associated with protection against liver tissue damage caused by effectors immune response against HCV and *Schistosoma mansoni*. The objective was to evaluate the peripheral natural (nTreg), induced (iTreg) and total T reg cells profiles in schistosomiasis (n=22), hepatitis C (n=25) and comorbidity (n=14) patients groups. The proportion of T reg was obtained by flow cytometry. Levels of IL-10 and TGF- β were obtained by ELISA and gene expression of FOXP3 by qPCR (Δ Ct comparative). There was a higher percentage of nTreg, iTreg and total T reg in schistosomiasis group in comparison to CM group ($p = 0.036$, 0.037 and 0.023 , respectively). Difference between the percentage of nTreg in schistosomiasis and hepatitis C groups ($p = 0.006$) was observed. When T reg cells were associated with fibrosis degree in hepatitis C and CM, no difference was found. The percentage of iTreg ($p = 0.026$) and total T reg ($p = 0.040$) were higher in schistosomiasis group in relation to CM group, when associated with D fibrosis pattern. Analyzing E/F fibrosis patterns between these two groups, the percentage of nTreg ($p = 0.046$) and total T reg ($p = 0.044$) were higher again in schistosomiasis group. IL-10 remained increased in the *S. mansoni* infected groups ($p = 0.023$). Hepatitis C ($p = 0.001$) and CM ($p = 0.048$) exhibited elevated levels of TGF- β in relation to schistosomiasis patients. The FOXP3 gene expression was 4.27 and 4.89 times greater in hepatitis C and schistosomiasis than in CM group. It is concluded that schistosomiasis patients had a higher percentage of T reg cells, high production of IL-10 and low levels of TGF- β in relation to hepatitis C and CM patients groups. This suggests that the highest percentage of T reg observed in disease with less morbidity is related to a protective effect against liver tissue damage.

Key words: Hepatitis C; schistosomiasis; comorbidity; regulatory T cells; immunopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Algoritmo para a confirmação diagnóstica de Hepatite C.	28
Figura 2 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica.	30
Figura 3 - Ciclo de transmissão da esquistossomose.	32
Figura 4 - Gráfico ilustrativo de citometria de fluxo realizada neste estudo.	54
Gráfico 1 - Quantificação de células T regulatórias na hepatite C, na esquistossomose e na comorbidade.	65
Gráfico 2 - Níveis das dosagens de IL-10 nos três grupos de pacientes.	74
Gráfico 3 - Níveis das dosagens de TGF- β nos três grupos de pacientes.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes quanto à idade e ao sexo.	60
Tabela 2 - Características dos pacientes quanto aos fatores de risco para infecção por <i>S. mansoni</i> e/ou HCV.	62
Tabela 3 - Percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade.	64
Tabela 4 - Associação entre o percentual de células T regulatórias e os graus de fibrose intragrupo nos pacientes com hepatite C.	65
Tabela 5 - Associação entre o percentual de células T regulatórias e a atividade inflamatória intragrupo nos pacientes com hepatite C.	66
Tabela 6 - Comparação entre o percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C e com a comorbidade, na associação com o grau de fibrose hepática.	67
Tabela 7 - Comparação entre o percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C e com a comorbidade, na associação com a atividade inflamatória.	68
Tabela 8 - Associação entre o percentual de células T reg e os padrões de fibrose intragrupo nos pacientes com esquistossomose.	69
Tabela 9 - Associação entre o percentual de células T reg e os padrões de fibrose intragrupo nos pacientes com a comorbidade.	70
Tabela 10 - Comparação entre o percentual de células T reg em pacientes com esquistossomose e com a comorbidade, na associação com o padrão D de fibrose hepática, classificação de Niamey.	71
Tabela 11 - Comparação entre o percentual de células T reg em pacientes com esquistossomose e com a comorbidade, na associação com os padrões E e F de fibrose hepática, classificação de Niamey.	72
Tabela 12 - Comparação das médias das dosagens de citocinas IL-10 e TGF- β entre os grupos de pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade.	73
Tabela 13 - Comparação das médias das dosagens de IL-10 e TGF- β , em relação aos graus de fibrose F2, F3 e F4, entre os grupos de pacientes com hepatite C e com a comorbidade.	75
Tabela 14 - Comparação das médias das dosagens de IL-10 e TGF- β , em	75

relação aos padrões de fibrose E e F, entre os grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade.

Tabela 15 - Expressão gênica de FOXP3 em leucócitos periféricos de pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade. 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Epidemiologia e transmissão da hepatite C	19
2.1.1 <i>Agente etiológico</i>	20
2.1.2 <i>A doença</i>	22
2.1.2.1 <u><i>Infecção aguda</i></u>	22
2.1.2.2 <u><i>Infecção crônica</i></u>	22
2.2 Imunopatologia da hepatite C	23
2.2.1 <i>Diagnóstico</i>	27
2.2.2 <i>Tratamento</i>	28
2.3 Esquistossomose mansônica	29
2.3.1 <i>Epidemiologia</i>	29
2.3.2 <i>Agente etiológico e ciclo de transmissão</i>	31
2.3.3 <i>A doença</i>	33
2.4 Imunopatologia da esquistossomose	35
2.4.1 <i>Diagnóstico</i>	37
2.4.2 <i>Tratamento</i>	38
2.5 Comorbidade hepatite c e esquistossomose	39
2.5.1 <i>Epidemiologia</i>	39
2.5.2 <i>Imunopatologia</i>	40
2.6 Células T regulatórias	41
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 Geral	47
4.2 Específicos	47
5 PERGUNTA CONDUTORA	48
6 METODOLOGIA	49
6.1 População estudada	49
6.2 Coleta de sangue	51
6.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	52
6.4 Fenotipagem celular ex vivo e citometria de fluxo	52

6.5 Avaliação dos níveis das citocinas IL-10 e TGF-β	54
6.6 Quantificação relativa da expressão gênica de FOXP3, utilizando PCR em tempo real	55
6.7 Desenho epidemiológico do estudo	58
6.8 Análise estatística	59
6.9 Considerações éticas	59
7 RESULTADOS	60
7.1 Dados epidemiológicos	60
7.2 Resultados obtidos na quantificação relativa de células T reg por citometria de fluxo	63
7.3 Resultados obtidos das dosagens de citocinas utilizando ELISA	73
7.4 Resultados da expressão gênica relativa de FOXP3, utilizando PCR em tempo real	76
8 DISCUSSÃO	77
9 CONCLUSÕES	100
10 PERSPECTIVAS	102
REFERÊNCIAS	103
ANEXO A – Parecer do comitê de ética	124
ANEXO B – Aprovação do artigo submetido à publicação	125
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido para o paciente	126
APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido para o indivíduo controle	127
APÊNDICE C – Modelo de questionário epidemiológico	128
APÊNDICE D – Artigo aceito para publicação	131

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C e a esquistossomose são doenças hepáticas crônicas e constituem importantes problemas de saúde pública no Brasil e em vários países do mundo. Quando se encontram associadas no mesmo indivíduo na comorbidade (CM), a lesão hepática provocada pelo vírus da hepatite C (HCV) pode evoluir mais rapidamente para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), o que pode agravar o quadro clínico do paciente e levá-lo a óbito em poucos anos (MORAIS, 2007; PEREIRA *et al.*, 1995, 2001).

Do ponto de vista imunológico, quando ocorre a infecção pelo HCV, há o aumento do número de células T efetoras que penetram no fígado através da veia porta e artéria hepática, entrando em contato com as células apresentadoras de antígeno (APCs) infectadas por este vírus (MORAIS, 2007). Durante a fase aguda, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são recrutados na tentativa de eliminar a infecção, sendo que o aparecimento destes últimos está relacionado com a diminuição da carga viral (COOPER *et al.*, 1999; SHEVACH, 2002; THIMME *et al.*, 2002). Além disso, as respostas imunes efetoras estão associadas com a cura clínica, sendo a ausência dessas respostas relacionadas à persistência da infecção e evolução para cronicidade (FERRI *et al.*, 2011; MORAIS, 2007). Há também outros fatores que contribuem para a cronicidade da doença, como falha na ativação de células T CD4⁺, fatores genéticos do hospedeiro e estratégias eficientes do HCV para escapar das respostas imunes inatas e adaptativas (BARNABA, 2010; DIEPOLDER, 2009; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

Embora a ação efetora dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados no parênquima hepático esteja associada com a cura clínica da hepatite C aguda, ela é a principal responsável pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose no fígado (FERRI *et al.*, 2011; POYNARD *et al.*, 2003). Na fase crônica, apesar da atividade pró-inflamatória ainda observada pelas células T CD4⁺ e citotóxica pelas T CD8⁺, a lesão hepática causada pelo HCV é geralmente de progressão lenta, evoluindo para cirrose em até 20 anos, isso quando não há associação com outras comorbidades (MORAIS, 2007).

Estudos mostram que a evolução lenta para a cronicidade durante a hepatite C se deve à existência de células T CD4⁺CD25⁺ conhecidas como células T regulatórias (T reg), que têm papel imunomodulador e supressor da resposta imune efetora (SAKAGUCHI, 2005; UNITT *et al.*, 2005; YOSHIZAWA *et al.*, 2010). As células T reg são subclassificadas em naturais ou “nT reg” (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e induzidas ou “iT reg” (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) e estas últimas só possuem efeito supressor quando na presença do antígeno (GAO *et al.* 2012; SUFFIA *et al.*, 2006). As células iTreg são um subgrupo de células T CD4⁺ *naive* que têm a função supressora ativada, devido a expressão de um marcador intracelular chamado fator de transcrição forkhead box P3 (FOXP3⁺) e secretam citocinas supressoras, como *transforming growth factor beta* (TGF-β) e interleucina (IL) 10 (AKBAR *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2012; UNITT *et al.*, 2005). As células nTreg suprimem a ativação e proliferação exagerada de linfócitos efetores T CD4⁺ e T CD8⁺ na resposta imune sistêmica contra antígenos próprios e não-próprios (GAO *et al.*, 2012) Ambas as populações atuam evitando o dano tecidual hepático desordenado quando há uma infecção aguda por HCV (FERRI *et al.*, 2011; UNITT *et al.*, 2005), podendo apresentar dessa forma um efeito protetor a este tecido. As células T reg também podem servir como preditor de evolução para cronicidade, uma vez que na fase aguda, as respostas predominantes são as Th1 e citotóxica. Já na fase crônica da hepatite C, a resposta imunológica tende a ser do tipo anti-inflamatória, incluindo a produção de citocinas IL-10 e TGF-β, além da verificação da presença do maior número de células T reg naturais e depois, as induzidas (TSAI *et al.*, 1997; TSENG *et al.*, 2012; YOSHIZAWA *et al.*, 2010).

Na literatura, existem lacunas e controvérsias sobre questões fundamentais para o entendimento dos mecanismos de imunorregulação exercidos pelas células T reg naturais e induzidas, inclusive frente à infecção pelo HCV. Alguns autores creem que o papel dessas células na resposta imune é prejudicial, uma vez que está associada à persistência viral e a cronicidade da infecção (CABRERA *et al.*, 2004), impedindo a total eliminação do HCV pelo organismo do hospedeiro. Outros, no entanto, afirmam que o papel das células T reg é protetor, impedindo que cargas virais elevadas possam potencializar uma resposta efetora dos linfócitos T frente ao

HCV, prejudiquem o tecido hepático intensamente e levem a uma evolução rápida para cirrose e CHC (FERRI *et al.* 2011; TSENG *et al.* 2012; UNITT *et al.*, 2005).

Em relação aos indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni* e com alta carga parasitária, após a eliminação de ovos do parasita nas fezes, há uma elevada produção de IL-10 e baixos níveis de interferon gama (IFN- γ) no soro (MONTENEGRO *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2004). Devido ao caráter predominante Th2 da resposta imune frente a esta doença, a evolução para a fase crônica é quase sempre observada, uma vez que a resposta Th2 inibe a ação de células Th1 e T CD8⁺ citotóxica. Este perfil favorece a não eliminação dos vermes, no entanto apresenta efeito protetor contra danos causados ao tecido hepático frente às respostas inflamatórias exacerbadas contra os antígenos parasitários, além de estimular a ativação de células T reg naturais e induzidas (LAYLAND *et al.*, 2010; MCKEE & PEARCE, 2004).

Acredita-se que as células T reg estejam envolvidas na resposta imune dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e que elas são responsáveis por suprimir a proliferação de linfócitos T CD4⁺ convencionais, através da produção de citocina IL-10 e em presença de TGF- β (GRAINGER *et al.*, 2010). Essas citocinas parecem ser responsáveis por regular as respostas imunes Th1 e citotóxica, polarizando ainda mais para o perfil Th2 e com isso, evitando danos mais graves ao tecido hepático (BAUMGART *et al.*, 2006).

No entanto, muitos dos mecanismos regulatórios da resposta imune frente à esquistossomose em humanos ainda permanecem desconhecidos e mais estudos são necessários para entender se o papel das células T reg e das citocinas por elas produzidas é prejudicial ou benéfico durante essa parasitose (ABATH *et al.*, 2006; BELKAID, 2007; LAYLAND *et al.*, 2010).

Ainda, quando há a presença da associação da hepatite C e esquistossomose no mesmo indivíduo, a resposta antiviral Th1 contra o HCV está suprimida pela presença de antígenos parasitários do *S. mansoni*, que induz fortemente a resposta imune Th2. Sendo a resposta Th1 crucial para o controle do vírus e da evolução da hepatite C (KAMAL; KHALIFA, 2006), a supressão dessa resposta pode levar a um comprometimento imunológico localizado da resposta efetora celular e favorecer a rápida replicação viral e o aparecimento de lesões hepáticas mais severas, fazendo

com que a hepatite C evolua mais rapidamente para a fase crônica e para as formas mais graves, com desenvolvimento de cirrose e CHC (FARID *et al.*, 2005; MORAIS, 2007; SERUFO; LAMBERTUCCI, 1997).

O papel das células T reg frente à comorbidade hepatite C e esquistossomose é um tema novo e muito pouco explorado ainda pela literatura e o papel dessas células, tanto na comorbidade quanto nas doenças isoladas, está ainda pouco esclarecido (YOSHIZAWA *et al.*, 2010).

A importância de se avaliar o papel das células T reg, tanto naturais quanto induzidas, frente à hepatite C, à esquistossomose e também à comorbidade, que é comum no Nordeste brasileiro, é de extrema relevância para o conhecimento da imunopatologia das duas doenças e da influência da comorbidade no grau de lesão hepática (GABRYSOVÁ *et al.*, 2011). Este estudo também poderá auxiliar no desenvolvimento de imunoterapia e vacinas. Além disso, a quantificação relativa das células T reg pode ser uma ferramenta complementar para mensurar o grau/padrão de fibrose hepática e para a avaliação da resposta imune, auxiliando nas medidas de controle destas enfermidades (DOLGANIUC; SZABO, 2008). Com isso, haverá melhora na qualidade de vida dos pacientes portadores da comorbidade, e também daqueles com hepatite C ou esquistossomose, isoladamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia e transmissão da hepatite C

Atualmente, a hepatite C é um grave problema de Saúde Pública no mundo, com cerca de 180 milhões de pessoas infectadas pelo HCV e prevalência mundial de 3% (CASTELLO *et al.* 2010; SEEFF, 2009). É a principal causa de hepatite crônica, cirrose e CHC no mundo ocidental, além de ser a maior causa de transplantes hepáticos no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA) (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). Estima-se que cerca de 27% dos casos de cirrose e 25% dos casos de câncer de fígado no mundo sejam causados pela infecção com o HCV (ALTER, 2007; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

No Brasil, a situação não é diferente. Estatísticas mostram que a prevalência da hepatite C no país pode chegar até 2,6%, sendo os estados do Sudeste os que possuem maior número de casos diagnosticados. Calcula-se que exista até 3,8 milhões de casos de hepatite C crônica no país, número bem acima do estipulado pelo último censo do Ministério da Saúde, realizado em 2000 (DIAMENT, 2007; VALENTE, 2005). Na região Nordeste, a prevalência desta doença no grupo de indivíduos entre 10 a 69 anos em 2010 foi de 0,7%, variando até 3,8%, dependendo da faixa etária analisada (BRASIL, 2011).

A transmissão do HCV ocorre principalmente por via parenteral, através do contato com sangue contaminado. No entanto, nem sempre é possível definir a via de infecção (BRASIL, 2008b). Antes da implantação, em 1993 dos testes sorológicos de rotina para triagem do sangue contaminado pelo HCV nos bancos de sangue brasileiros, o maior fator de risco para a infecção pelo vírus C era as transfusões de sangue ou hemoderivados durante esses procedimentos. Porém, essa forma de infecção tem se tornado cada vez mais rara nos dias atuais, por conta do maior controle das bolsas de sangue para hemotransfusão, havendo dessa forma diminuição da incidência da doença em pacientes transfundidos (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

Atualmente, o principal fator de risco apontado na literatura é o compartilhamento e a reutilização de agulhas e seringas pelos usuários de

medicamentos ou de drogas ilícitas, que ocorre na maioria dos países industrializados (KAMAL, 2008; WASLEY; GRYTDAL; GALLANGHER, 2008). Ainda, procedimentos invasivos em serviços de saúde, como endoscopias e colonoscopias, têm se tornado fatores de risco importantes para adquirir esta infecção (ELDIN *et al.*, 2008; KAMAL, 2008; MARTINEZ-BAUER *et al.*, 2008; SANTANTONIO; WIEGAND; GERLACH, 2008). Alguns autores afirmam ainda que se pode adquirir o HCV através da exposição ocupacional, da transmissão vertical, do contato sexual com indivíduos portadores do vírus C e do compartilhamento de objetos pessoais, como giletes, barbeadores, tesouras e alicates contaminados com gotículas de sangue entre várias pessoas (COX *et al.*, 2009; IRVING *et al.*, 2008). A transmissão vertical é rara quando comparada à hepatite B, porém já foi demonstrado que gestantes com carga viral elevada de HCV ou co-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam um risco maior de transmissão da doença para os recém-nascidos (STRAUSS, 2001).

A possibilidade de infecção através do contato sexual é mais rara, contudo esta pode ocorrer principalmente em pessoas com múltiplos parceiros ou entre os homossexuais masculinos ou aqueles que usualmente praticam sexo sem uso adequado de preservativo. Também quando há coexistência com outras doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o HIV, a transmissão do HCV torna-se mais comum (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1998; BRASIL, 2008b).

Em vista disso, o padrão epidemiológico encontrado em indivíduos portadores do HCV no mundo é diverso, com diferentes fatores de risco predominantes e isto pode ser reflexo das diferentes condições socioeconômicas dessas populações (KAMAL, 2008).

2.1.1 Agente etiológico

O HCV, descoberto por Choo *et al.* (1989), é o agente etiológico da hepatite C e é constituído por uma cadeia simples de ácido ribonucleico (RNA), com polaridade positiva e genoma de aproximadamente 9.600 nucleotídeos (GAD *et al.*, 2001). Este vírus pertence ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae* e tem como

característica principal o tropismo por hepatócitos, embora este tenha sido encontrado também infectando células dendríticas e células linfocitárias do tipo B (BAIN *et al.*, 2001; SUNG *et al.*, 2003).

O HCV é capaz de sintetizar proteínas estruturais e não estruturais no citoplasma da célula infectada através de mecanismos que utilizam proteases virais e celulares (MOURÃO *et al.*, 2008; THOMSON; FINCH, 2005). As proteínas estruturais do HCV são três: *core*, envelope 1 (E1) e E2. As proteínas não estruturais (NS) são sete: p7, NS-2, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A e NS- 5B, sendo as duas últimas responsáveis pela replicação do vírus (STRAUSS, 2001).

Através da análise de sequência nucleotídica, sabe-se que existem até o momento seis diferentes genótipos do HCV, numerados de 1 a 6, e para cada um desses, há uma grande variedade de subtipos (mais de 100), diferenciados por uma letra minúscula após o número do genótipo (SIMMONDS *et al.*, 1994). Alguns genótipos têm distribuição mundial, porém outros são encontrados apenas em regiões restritas do mundo (THOMPSON; FINCH, 2005).

No Brasil, os genótipos mais frequentes são o 1, 2 e 3 (ALVARIZ, 2004). Devido à capacidade mutagênica do HCV, com alta taxa de replicação viral, a sequência nucleotídica e a imunogenicidade da maior parte da população viral muda rapidamente. Isso está provavelmente associado ao mecanismo de escape à resposta imune do hospedeiro, o que pode ser um fator esclarecedor no desenvolvimento da cronicidade por parte da maioria dos portadores (FARCI *et al.*, 2000). O genótipo 4 não é normalmente encontrado no Brasil (MOURÃO *et al.*, 2008).

Mourão *et al.* (2008) defendem que a determinação dos genótipos é de grande importância não só para o estudo epidemiológico, como também para a prática clínica, uma vez que certos genótipos podem ou não estar associados a uma maior gravidade da doença e com a resposta terapêutica antiviral. Já Ghany *et al.* (2009) dizem que este fator não altera em nada o curso natural da doença.

2.1.2 A doença

2.1.2.1 Infecção aguda

Apenas 20 a 30% dos casos agudos de hepatite C são sintomáticos, tornando-a desta forma, muito difícil de ser detectada na fase aguda (HELLER; REHERMANN, 2005; MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). Os sintomas mais comuns são: febre, náusea, icterícia, fadiga e anorexia e por serem inespecíficos, são muitas vezes confundidos com outras enfermidades. Outro fator limitante para o diagnóstico precoce é a falta de marcadores imunológicos específicos capazes de identificar essa doença no início (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

É do conhecimento que apenas um pequeno número de indivíduos (15%) consegue controlar a infecção aguda espontaneamente, o que sugere que a resposta imune ao HCV na maioria das vezes seja ineficiente (FUNG; LOK, 2005). Mesmo com respostas imunes deficientes para a eliminação do vírus, esses indivíduos são frequentemente assintomáticos e são mais propensos a evoluírem para a forma crônica da hepatite C (POYNARD *et al.*, 2003).

O tempo de incubação e o aparecimento dos sintomas clínicos são variáveis, de 1 a 13 meses (STRAUSS, 2001), e o método diagnóstico mais eficaz é a detecção do RNA viral no soro, que pode aparecer a partir da primeira ou segunda semana após a infecção. No entanto, este método é caro e na prática clínica é normalmente usado para quantificar a carga viral, apenas quando a verificação de anticorpos contra o HCV (anti-HCV) através de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) é considerado reagente. Porém, o ELISA não é um método adequado para diagnosticar a infecção pelo HCV no seu estágio inicial, uma vez que a soroconversão pode ocorrer apenas entre 4 a 6 semanas após o contágio (HELLER; REHERMANN, 2005; THOMAS; SEEF, 2005).

2.1.2.2 Infecção crônica

Os mecanismos que levam o indivíduo a desenvolver a forma crônica da doença ainda não foram totalmente elucidados (STRAUSS, 2011). Entre os

indivíduos infectados, cerca de 85% dos casos evoluem para esta fase, que é caracterizada pelo caráter debilitante, devido às graves lesões que acometem o tecido hepático durante o curso natural da doença (ALTER, 2007). Estas lesões evoluem para fibrose hepática e a progressão desta evolução é variável e não necessariamente ocorre de maneira semelhante em indivíduos com o mesmo tempo de infecção (STRADER *et al.*, 2004; THOMSON; FINCH, 2005).

Entre os indivíduos cronicamente infectados, 20% a 30% desenvolvem cirrose, na qual ocorre severa alteração das funções hepáticas, com morte celular dos hepatócitos e com intensa produção de tecido fibroso e substituição das células hepáticas por este tecido. De 2 a 5% dos pacientes com hepatite C crônica têm chance de evoluir para CHC após o diagnóstico de cirrose (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). Essas complicações evoluem entre 21 ± 10 anos, para cirrose, e 29 ± 10 anos, para CHC, após a infecção pelo HCV (GILLEECE *et al.*, 2005).

Na fase crônica, a hepatite C pode ocorrer com ou sem a alteração das aminotransferases, e ser associada ou não à inflamação crônica e fibrose hepática progressiva. Apesar da detecção dos níveis de RNA do vírus no soro, 1/3 dos indivíduos infectados apresentam os níveis de alanina aminotransferase (ALT) persistentemente normais (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

2.2 Imunopatologia da hepatite C

A resposta imune induzida pelo HCV está diretamente relacionada com a progressão das lesões hepáticas e acredita-se que a eliminação ou persistência do vírus está relacionada com a qualidade da resposta imunológica efetora específica (STRAUSS, 2001). As células da imunidade inata ativam linfócitos *natural killer* (NK) que secretam IFN- γ , além de ampliar a produção de quimiocinas responsáveis pela migração de linfócitos efetores para o parênquima hepático. A partir de então, células T citotóxicas e auxiliares reconhecem o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) I e II e os subprodutos virais (peptídeos) nas APCs, principalmente nas células dendríticas e nos hepatócitos infectados e dessa forma, vão desenvolver suas funções específicas (THIMME *et al.*, 2002).

A cura espontânea durante a fase aguda da doença é associada a uma resposta vigorosa dos linfócitos efetores T CD8⁺ e CD4⁺ aos epítomos antigênicos estruturais e não-estruturais do HCV (LECHNER *et al.*, 2000).

No entanto, a não eliminação do patógeno e o grau de lesão hepática parecem estar ligados ao desequilíbrio das respostas Th1 e Th2. Uma das causas para a persistência viral, é que durante a fase inicial da infecção pelo HCV, alguns linfócitos T CD8⁺ apresentam uma dificuldade em secretar IFN- γ , não sendo possível dessa forma um eficiente controle da viremia, ocorrendo uma deficiência no controle da infecção, deleção dos linfócitos T CD8⁺ não reativos e progressão para a forma crônica da doença (KLENERMAN; THIMME, 2012). Os mecanismos responsáveis por isto ainda não estão esclarecidos, mas uma hipótese plausível é a exaustão celular ocorrida devido à superestimulação antigênica, que contribui para o escape viral e cronicidade da infecção (JANEWAY, 2007).

Ambas as respostas Th1 e Th2 são efectoras, porém agem antagonicamente, uma vez que a IL-4 e a IL-10 produzidas pelo perfil Th2 ao mesmo tempo em que estimulam a formação de anticorpos, com ação anti-inflamatória, inibem as células Th1, as quais secretam IL-2 e IFN- γ , relacionadas com a resposta antiviral citotóxica do hospedeiro. Contudo, ainda não se sabe quais elementos condicionam o direcionamento para um ou outro tipo de resposta no indivíduo (MISSALE *et al.*, 1998, 2004).

Uma variedade de fatores pode contribuir para a cronicidade da infecção, dentre eles: mutação viral ou escape viral, como resposta à ação de linfócitos T efetores, falha na resposta efetora imune, anergia de linfócitos T CD4⁺, exaustão de linfócitos T CD8⁺, indução de células T reg e diminuição da capacidade de apresentação de antígeno pelas células dendríticas (CABRERA *et al.*, 2004; CLAASSEN *et al.*, 2010; FULLER *et al.*, 2010; GRUENER *et al.*, 2001; LE-GUILLOU-GUILLEMETTE *et al.*; TESTER *et al.*, 2005; ULSENHEIMER *et al.*, 2003).

Do ponto de vista da imunopatologia, o reconhecimento dos hepatócitos infectados pelo HCV pelas células efectoras do sistema imune pode causar lesões hepáticas extremamente variáveis, com diferentes intensidades de lesões necro-inflamatórias. Por outro lado, quando o papel das células citotóxicas torna-se ineficiente, o processo inflamatório e a destruição hepática deixam de ser contínuos,

e isto pode favorecer a não eliminação total do vírus. Este fato indica que o vírus pode utilizar estratégias eficientes para evitar as respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro (MISSALE *et al.*, 2004; POYNARD *et al.*, 2003). Apesar disso, segundo Strauss *et al.* (2001), não há associação entre a atividade inflamatória e o desenvolvimento da fibrose hepática, o que leva a crer que outros fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento destas lesões no fígado.

Kamal *et al.* (2000a) mostraram que a proteína *core* do HCV pode ser capaz de promover alterações celulares, simulando moléculas próprias do indivíduo e desta forma, impedir o reconhecimento pelo sistema imune efetor para a eliminação do vírus C. No entanto, não existem muitas evidências que genótipo e carga viral influenciem diretamente na progressão da fibrose, embora ambos sejam importantes na avaliação da resposta ao tratamento e na sua duração (COSTA *et al.*, 2002; FREEMAN *et al.*, 2003; KAMAL *et al.*, 2004; KAMAL *et al.*, 2006; POYNARD *et al.*, 2003).

Outros fatores também podem contribuir para a cronicidade da doença, como falha na resposta de células T CD4⁺ na estimulação de linfócitos T CD8⁺, fatores genéticos do hospedeiro que codificam o tipo de MHC responsável pela apresentação de antígeno viral e estratégias eficientes do HCV para escapar das respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). Entretanto, um dos fatores mais relevantes para a evolução da hepatite C parece ser o estado imunológico dos indivíduos. A doença tende a evoluir mais rapidamente para cirrose e CHC em pacientes crônicos ou imunossuprimidos quando comparada aos imunocompetentes (STRAUSS, 2001). Um exemplo é na co-infecção HCV-HIV, onde a progressão da hepatite C apresenta-se mais rápida, diferentemente dos pacientes HIV negativos (SORIANO *et al.*, 1999).

Atualmente, um grupo de células do sistema imune, as células T regulatórias (T reg), tem despertado o interesse da comunidade científica e vem sendo estudado com maior ênfase. Acredita-se que evolução lenta para a cronicidade durante a hepatite C se deve à existência destas células na circulação sanguínea e no tecido hepático infectado, uma vez que elas apresentam atividade imunomoduladora e supressora na resposta imune (UNITT *et al.*, 2005; YOSHIZAWA *et al.*, 2010).

Entre as células T reg, há um subgrupo dessas células chamadas de nTreg que é caracterizado pela expressão do marcador de superfície CD25⁺ e de um marcador intracelular chamado FOXP3⁺ (AKBAR *et al.*, 2007; UNITT *et al.* 2005). As nTreg são formadas no timo, a partir da estimulação por antígenos próprios durante a maturação dos linfócitos e são responsáveis pela imunossupressão de doenças autoimunes sistêmicas e também atuam no controle da imunidade efetora contra antígenos microbianos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Entretanto, existe outro subgrupo de células T CD4⁺, as iTreg, que não apresenta o marcador de superfície CD25 (CD25⁻) e é formado fora do timo em um microambiente onde há a estimulação por antígenos não-próprios e com grandes concentrações de citocinas como IL-10 e TGF-β e devido a esses estímulos, são induzidas a expressar o FOXP3⁺ (O'GARRA; VIEIRA, 2004; ZHENG *et al.*, 2004).

As células T reg têm como funções principais a supressão da ativação e da proliferação exacerbada de linfócitos efetores T CD4⁺ e T CD8⁺, e a secreção de citocinas supressoras (TGF-β e IL-10), evitando dessa forma o dano tecidual hepático desordenado causado pela resposta imune adaptativa vigorosa frente à infecção pelo HCV (UNITT *et al.*, 2005). Além disso, nTreg estimuladas logo no início da infecção pelo HCV podem produzir IL-10, que contribui para potencializar o efeito da exaustão celular e supressão de linfócitos T CD8⁺. Esta exaustão acontece em cerca de metade dos linfócitos T CD8⁺ circulantes diminuindo a capacidade efetora destas células (BENGSCHE *et al.*, 2010).

Em vista disso, acredita-se que as células T reg apresentam um efeito protetor ao tecido hepático no indivíduo, uma vez que modulam ou controlam respostas imunes efetoras exacerbadas (BILLERBECK; BÖETTLER; THIMME, 2007).

Resultados divergentes sobre o papel das células T reg são encontrados na literatura, e por isso há lacunas a serem elucidadas sobre o seu mecanismo supressor na infecção pelo HCV. Cabrera *et al.* (2004) acreditam que a ação das células T reg não é influente na resposta imune como um todo, uma vez que a hepatite C parece estar mais associada à persistência viral, que leva à cronicidade da infecção. Por outro lado, Unitt *et al.* (2005) afirmam que as células T reg apresentam uma função benéfica, pois impedem que cargas virais elevadas, que

podem ter a sua ação potencializada pela resposta de linfócitos efetores, prejudiquem o tecido hepático intensamente e levem a sua destruição severa.

2.2.1 Diagnóstico

O método mais utilizado atualmente para diagnóstico da infecção pelo HCV é o ELISA de 3ª geração para detecção de anticorpos anti-HCV, apresentando elevada sensibilidade (99%), quando o paciente não está no período de janela imunológica, além de relativo baixo custo (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010; STRAUSS, 2001).

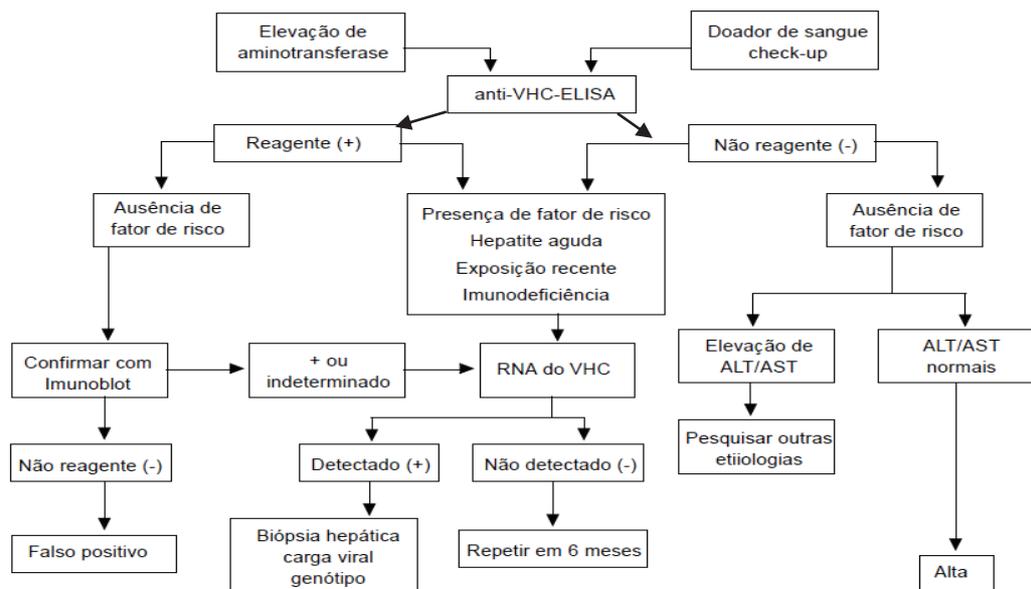
Mesmo com alta sensibilidade, o ELISA de 3ª geração pode apresentar resultados falso-negativos nas primeiras semanas após a infecção pelo HCV. Neste sentido, técnicas de biologia molecular, embora menos acessíveis, além de dispendiosas e complexas, ganharam espaço e mostraram ser necessárias para a confirmação diagnóstica. Através da detecção qualitativa do RNA viral, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), é possível detectar menos de 100 cópias de RNA viral/ml de soro (POYNARD, 2003). Devido a isto, torna-se possível detectar a viremia em exposições recentes, em fases iniciais da hepatite aguda, em imunossuprimidos e também auxiliar na confirmação de casos negativos que possuem alto risco (STRAUSS, 2001; MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

Nos casos de início ou monitoramento de tratamento, a quantificação da carga viral mostrou-se muito útil para avaliar a resposta terapêutica à droga. Além disso, a determinação do genótipo e os valores quantitativos auxiliam na definição da duração do tratamento (PAWLITSKY, 2002; STRAUS, 2001).

Outro método diagnóstico bastante utilizado é a avaliação histológica através da biópsia hepática (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). No entanto, esta técnica só é recomendada após a confirmação diagnóstica através de ELISA e a quantificação da carga viral, para avaliar o grau de dano hepático, uma vez que é uma técnica invasiva e dolorosa. A biópsia também se mostrou importante na decisão terapêutica e é capaz de fornecer subsídios quanto à confirmação da etiologia pelo HCV (STRAUSS, 2001).

A Figura 1 nos mostra o esquema diagnóstico recomendado para identificar a infecção pelo HCV mais eficientemente, evitando ao máximo os falsos resultados positivos e negativos.

Figura 1 - Algoritmo para a confirmação diagnóstica de Hepatite C.



Fonte: Schiff; Medina; Kahn (1999).

Legenda:

ALT: Alanina aminotransferase
 AST: Aspartato aminotransferase
 RNA: Ribonucleic acid
 VHC: Vírus da hepatite C

2.2.2 Tratamento

O principal objetivo do tratamento para hepatite C é impedir a progressão da fibrose hepática, através da inibição da replicação viral do HCV. Entre as drogas disponíveis no mercado, o interferon α -peguilado e a ribavirina, apesar de serem as drogas de escolha, apresentam em alguns casos baixa eficácia terapêutica e provocam importantes efeitos colaterais, como astenia, dores de cabeça, enjoos, cansaço físico (KAMAL *et al.*, 2000b). Elas costumam ser administradas por um longo período de tempo, em torno de um a dois anos, dependendo do genótipo do vírus, e por isso exige constante monitoração médica e laboratorial especializada do

paciente. Também como fator limitante do uso dos medicamentos, está o alto custo do processo terapêutico, no caso do Brasil, isso limita as pessoas portadoras do HCV aos serviços de distribuição de medicamentos do Sistema Único de Saúde – SUS (STRAUSS, 2001).

O tratamento da hepatite C crônica está indicado nas seguintes situações: ser portador do HCV identificado por detecção de RNA no soro; ter realizado biópsia hepática na qual tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e/ou presença de fibrose de moderada a intensa, nos últimos 24 meses; ter entre três e 70 anos; ter contagem de plaquetas acima de $50.000/\text{mm}^3$ e de neutrófilos acima de $1.500/\text{mm}^3$ (BRASIL, 2008b).

Para a utilização do interferon- α peguilado, uma variação do interferon- α com maior tempo de meia vida e menor toxicidade, os pacientes devem estar enquadrados nos critérios citados anteriormente e também serem portadores do genótipo 1 do HCV (BRASIL, 2008b).

Apesar dessas indicações, ainda há dúvidas na comunidade médico científica sobre o melhor esquema terapêutico para cada tipo de paciente, quais indivíduos devem ser tratados e quando iniciar o tratamento (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

2.3 Esquistossomose mansônica

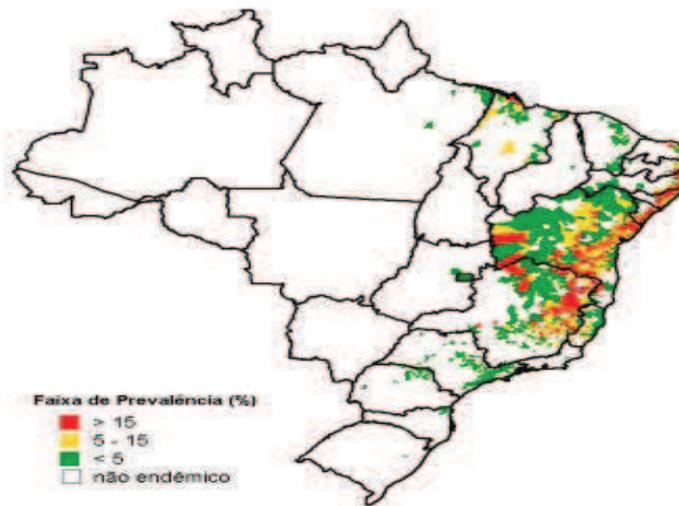
2.3.1 Epidemiologia

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária crônica, causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, que acomete o tecido hepático e veias mesentéricas e afeta cerca de cerca de 200 milhões de pessoas no mundo (CHITSULO *et al.*, 2000; GRYSEELS *et al.*, 2006). Esta doença é encontrada em 52 países e territórios como: América do Sul, África, Caribe e Leste do Mediterrâneo, sendo os países como Egito, Sudão e Brasil, regiões consideradas endêmicas no mundo (BRASIL, 2005). Sua ocorrência está diretamente relacionada às condições sócio-ambientais, educacionais e econômicas precárias das populações (ARAÚJO *et al.*, 2007), por isso é mais comum em países em desenvolvimento.

No Brasil, as áreas endêmicas se estendem desde o litoral do Rio Grande do Norte até a Bahia, além de haver focos no interior do Espírito Santo e de Minas Gerais e em outros estados da região Norte, Sudeste e Sul (Figura 2) (BRASIL, 2005). As mais altas taxas de prevalência encontram-se na região do Nordeste, com valores também elevados nos estados de Espírito Santo e Minas Gerais (BRASIL, 2005).

Em 1971, através de um inquérito epidemiológico, foi estimado que no Brasil o número de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* era de 5 a 6 milhões (REY, 2008). Raia, Mies e Alfieri (1991) estimaram que haveria 12 milhões de indivíduos infectados no país. Contudo, a quantidade de pessoas infectadas por *S. mansoni* é incerta, uma vez que medidas de controle e de políticas públicas de prevenção, de diagnóstico e tratamento foram realizadas desde o passado até os dias atuais, além da crescente migração de moradores da área rural para a área urbana (BARBOSA *et al.*, 2004).

Figura 2 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica.



Fonte: GT-Esquistossomose/CDTV/CGDT/SVS/MS (BRASIL, 2004).

Em Pernambuco, a área endêmica para esquistossomose ocupa 79 dos 167 municípios do estado, dos quais 55 estão na zona Litoral-Mata e 24 no Agreste (FAVRE *et al.*, 2001). Apesar de ser historicamente predominante na Zona da Mata,

novas notificações e focos de vetores da doença no litoral apontaram uma expansão da endemia com mudança no perfil clínico-epidemiológico (ARAÚJO *et al.*, 2007).

2.3.2 Agente etiológico e ciclo de transmissão

O agente etiológico da esquistossomose é o platelminto do gênero *Schistosoma*, pertencente à classe Trematoda (NEVES, 1995; REY, 2008). Este verme possui sexos separados (dióicos) e um acentuado dimorfismo sexual. São três espécies importantes causadoras de patologia no homem: *S. mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma hematobium*, cada uma possuindo características morfológicas e fisiológicas peculiares, com distribuição geográfica diferente e localização topográfica distintas no organismo do hospedeiro definitivo (REY, 2008).

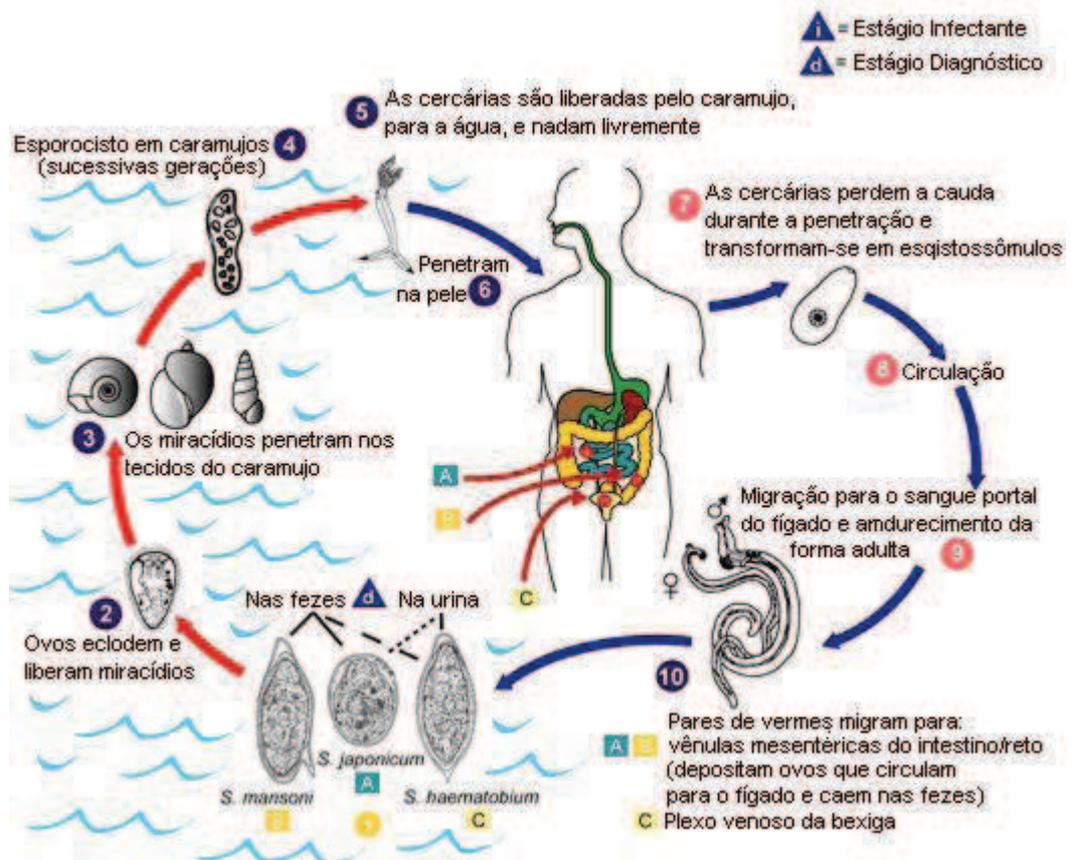
A esquistossomose teve início nas Américas, principalmente durante o período da migração de mão de obra escrava africana no tempo da colonização. Graças à presença de moluscos suscetíveis e boas condições ecológicas que favoreceram o ciclo de vida do parasita, a espécie *S. mansoni* conseguiu se fixar neste continente (NEVES, 1995; REY, 2008).

As três espécies de caramujos importantes para a transmissão da esquistossomose que são encontradas no Brasil são do gênero *Biomphalaria*, sendo eles: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (MALAGUEÑO; SANTANA, 1994). De acordo com a distribuição geográfica, foi observado que as espécies *B. glabrata* e *B. straminea* são encontradas na região Nordeste do país (REY, 2008).

O ciclo biológico é heteróxico, com várias formas larvárias e pelo menos um hospedeiro intermediário (Figura 3). O homem ao eliminar as fezes junto às coleções de água, libera os ovos do parasita, que contamina lagos e rios. Os ovos contêm miracídeos, que são liberados nessa água e conseguem penetrar nos hospedeiros intermediários: os caramujos. Dentro deles, os miracídeos evoluem até a fase de esporocisto, multiplicam-se e transformam-se em cercárias, que são a forma infectante do verme para os hospedeiros vertebrados. Quando liberadas na água, estas nadam até encontrarem o seu hospedeiro definitivo, que na maioria das vezes é o homem (REY, 2008).

Após as cercárias penetrarem ativamente pela pele ou mucosa do hospedeiro e perderem sua cauda, elas se transformam em esquistossômulos, migram através da corrente sanguínea ou linfática, até o sistema porta intra-hepático e, em até 30 dias, se transformam em vermes adultos. Quando atingem a maturação sexual, os vermes adultos, machos e fêmeas, migram acasalados contra a corrente sanguínea, alcançam as ramificações mais finas da veia mesentérica inferior e as vênulas do plexo hemorroidário superior, e lá as fêmeas depositam seus ovos na mucosa ou submucosa do reto, do sigmóide ou das regiões mais altas do intestino. Cerca de 40 dias após a infecção, os ovos que atravessaram a mucosa até a luz intestinal são eliminados pelas fezes, dessa forma recomeçando o ciclo (REY, 2008). Os ovos que não conseguem ser eliminados podem ficar retidos na mucosa intestinal ou serem arrastados para o fígado através da corrente sanguínea, onde lá vão originar os granulomas (NEVES, 1995).

Figura 3 - Ciclo de transmissão da esquistossomose.



Fonte: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN_Esquito.htm

Embora alguns grupos sejam mais suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni*, a transmissão da esquistossomose ocorre independente do sexo, raça ou idade, uma vez que, ao entrar em contato com águas superficiais contaminadas com a presença de cercárias, qualquer indivíduo pode se infectar e desenvolver a parasitose (BRASIL, 2008a).

2.3.3 A doença

A infecção humana pelo *S. mansoni* é, na maioria das vezes, assintomática ou oligossintomática. No entanto, durante esta infecção, ocorrem alterações anatomopatológicas do tecido hepático e mesentérico de graus variáveis e que podem expressar situações clínicas diferentes, com um prognóstico incerto (RAIA; MIES; ALFIERI, 1991; REY, 2008). A etnia do hospedeiro definitivo, a carga parasitária, as características e condições de vida dos indivíduos, a duração da infecção e as condições imunológicas são alguns dos fatores que influenciam o quadro inicial e o processo patológico da esquistossomose. Em vista disso, esta doença é caracterizada por várias formas clínicas, desde as leves, assintomáticas, comuns em habitantes de áreas endêmicas, até as formas mais graves e limitantes (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; REY, 2008).

Apesar da gravidade que as lesões causadas pelo verme possam provocar, a maioria dos pacientes infectados apresenta quadros relativamente benignos. A primeira lesão relatada é o exantema, que aparece na pele após a penetração das cercárias, acompanhada de prurido e outros tipos de reações alérgicas. Essas reações costumam durar entre dois e três dias, e depois regredem (REY, 2008). Em regiões endêmicas, os exatemas podem não ser notados (HUGGINS; SANTOS, 1994; REY, 2008).

Na fase aguda da esquistossomose, a maioria dos pacientes não apresenta sintomas importantes ou eles podem ser confundidos com outras enfermidades, por serem inespecíficos. Os sintomas mais comuns dessa fase são astenia, mal-estar, febre, dores abdominais e diarreia. Nesta fase, o diagnóstico pode ser difícil. Ainda, o fígado e o baço podem estar aumentados, com abdome distendido e doloroso.

Também é possível observar uma leucocitose moderada, com quantidades relativas de 25 a 50% de eosinófilos (REY, 2008).

Os ovos do parasita aparecem nas fezes em até seis semanas após a infecção (REY, 2008), o que pode retardar o diagnóstico através de métodos parasitológicos (BARBOSA *et al.*, 2004). Como a fase aguda geralmente é inespecífica em indivíduos moradores de áreas endêmicas, o diagnóstico geralmente só é realizado quando o portador já evoluiu para a fase crônica da esquistossomose (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

Exposições à reinfecções sucessivas e elevadas cargas parasitárias geralmente favorecem a evolução da doença para a fase crônica, com formas clínicas mais distintas e sintomáticas que podem ser divididas em: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica (EHE) e extra-hepática (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; PORDEUS *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas da forma intestinal e hepatointestinal são praticamente as mesmas, embora na segunda um maior acometimento hepático seja observado, com o fígado aumentado no exame clínico, principalmente o lobo esquerdo (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

A EHE caracteriza-se pelo aumento do fígado e baço, causando o comprometimento funcional desses órgãos (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994). O principal fator para a morbidade da esquistossomose é devido à deposição de ovos pelo *S. mansoni* na veia porta. Os ovos são levados pela circulação sanguínea até o tecido hepático, podendo ficar retidos nos capilares deste órgão e induzir uma resposta inflamatória local dependente de células T, com a formação de granulomas e com congestão hepática (REY, 2008). Como consequência, o paciente apresentará fibrose hepática periportal, com hipertensão portal, o que pode levar à formação de circulação colateral, varizes esofágicas e gástricas (RAIA; MIES; ALFIERI, 1991). O rompimento dessas varizes causa hemorragia digestiva alta recorrente, podendo levar o indivíduo ao óbito (ANDRADE, 2009). O hiperesplenismo ocorre devido à associação da esplenomegalia (aumento do baço), decorrente da hipertensão portal e o aumento da função do baço (MAIA, 2002).

Nesse estágio, os exames hematológicos apresentam plaquetopenia, leucopenia e anemia devidas principalmente ao hiperesplenismo. Também se podem observar desordens da coagulação sanguínea (REY, 2008).

O quadro clínico na EHE descompensada é mais grave, caracterizado por hemorragias, ascite e edemas. Circulação colateral superficial e aparecimento de insuficiência hepática pronunciada também podem ser observados (RAIA; MIES; ALFIERI, 1991; REY, 2008).

2.4 Imunopatologia da esquistossomose

Inicialmente, a cercária ao penetrar na pele do hospedeiro, se transforma em esquistossômulo, que leva à estimulação da produção de imunoglobulina E (IgE). Esse anticorpo vai sensibilizar os mastócitos, que vão aderir ao parasita, que por sua vez já se encontra revestido por substâncias do sistema complemento. Os mastócitos têm a propriedade de liberar mediadores químicos, como os fatores quimiotáticos capazes de recrutar eosinófilos, que possuem ação citotóxica, destruindo o tegumento do verme (REY, 2008). Ainda assim, normalmente, a eliminação do verme não é verificada. Um dos motivos para que isso aconteça é que o *S. mansoni*, ao mimetizar antígenos com os do hospedeiro vertebrado, adsorvidos ou incorporados em sua membrana, confere ao parasita um mecanismo de escape da resposta imunológica efetiva (REY, 2008).

A imunopatologia da esquistossomose é caracterizada pela resposta efetora das células T contra os ovos que ficam presos nos tecidos hepáticos e mesentéricos (PEARCE *et al.*, 2002). Essa resposta imune é principalmente do tipo Th2, que suprime ações citotóxicas e pró-inflamatórias de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ do tipo Th1, promovendo a formação do granuloma esquistossomótico no tecido hepático (PEARCE *et al.*, 2002; WYNN *et al.*, 2004). Esse perfil favorece a não eliminação dos vermes. No entanto, ele apresenta um efeito protetor contra danos causados ao tecido hepático, originados por células imunes efetoras que atuam contra os antígenos parasitários (MCKEE *et al.*, 2004).

Estudos feitos em camundongos mostraram que o perfil Th2 aumenta os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, estimuladoras da produção de prolina,

aminoácido essencial para a formação das fibras de colágenos, presentes nos granulomas (GRZYCH *et al.*, 1991; HESSE *et al.*, 2001). A IL-10 também é responsável pela polarização do perfil Th1 para o perfil Th2, evitando danos mais graves ao tecido hepático infectado (BAUMGART *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2001; MONTENEGRO *et al.*, 1999). Além disso, outros estudos mostraram que camundongos com deficiência na produção de IL-4 e IL-10 exibiram uma resposta Th1 mais eficiente, e que apesar de ainda existir formação de granulomas, houve aumento da hepatotoxicidade e das taxas de mortalidade dos animais, o que sugere que a resposta Th2 efetiva esteja relacionada com um melhor prognóstico (FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN ; CHEEVER; WYNN, 2000; EDWARDS *et al.*, 2005).

Ainda, os ovos de *S. mansoni* podem se acumular no cólon e provocar uma inflamação neste tecido, com polarização da resposta Th2 promovendo a evolução para a cronicidade da doença (TURNER *et al.*, 2011).

No entanto, pessoas não infectadas e residentes de áreas endêmicas para esquistossomose produzem mais IFN- γ em resposta aos antígenos parasitários do que aquelas com infecções adquiridas e não residentes em áreas endêmicas (VIANA *et al.*, 1994), indicando que a intensidade de infecção por *S. mansoni* afeta a produção e a imunomodulação de citocinas contra este patógeno (ABATH *et al.*, 2006). Ao contrário do que ocorre nos pacientes com esquistossomose aguda, o perfil de citocinas nos pacientes com esquistossomose intestinal e hepatointestinal é principalmente Th2, com produção de IL-10, que embora induza à cronicidade, possui efeito protetor ao tecido hepático (ARAÚJO *et al.*, 1994, 1996; MWATHA *et al.*, 1998). Nos pacientes hepatoesplênicos, há um aumento dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ , mas o perfil de resposta Th2 se mantém (CONTIGLI *et al.*, 1999), demonstrando esta resposta ser ponto decisivo na progressão da fibrose hepática durante a esquistossomose crônica (ABATH *et al.*, 2006).

Recentemente, foi descoberto que as células T reg também apresentam um papel imunológico no controle da esquistossomose, produzindo IL-10, assim como as células Th2 (HESSE *et al.*, 2004; MCKEE; PEARCE, 2004). Um estudo mostrou que a transferência de células T reg em camundongos com deficiência de IL-10, conferiu uma redução na resposta pro-inflamatória, com redução dos níveis de IFN- γ

(MCKEE; PEARCE, 2004) e outra pesquisa sugere que as células T reg, além de suprimirem o desenvolvimento das células Th1, também conseguem limitar a magnitude das respostas Th2 (TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006).

As T reg naturais e as induzidas, que são conhecidas por suprimir respostas Th1 e serem encontradas em mucosas, respectivamente, podem ser estimuladas durante a deposição de ovos no intestino e também no fígado, onde granulomas são formados. Com o aumento dos níveis de TGF- β produzido por estas células, foi observada a diminuição da inflamação nos linfonodos locais e a redução do tamanho do granuloma e da fibrose, com diminuição da produção de colágeno neste tecido (TURNER *et al.*, 2011). A supressão ou remoção de células T reg *in vitro* promove um aumento do número de eosinófilos na circulação e aumento do tamanho do granuloma. Provavelmente, as células T reg induzidas controlam a inflamação nos granulomas durante a infecção crônica e são necessárias para conter a patologia durante uma infecção esquistossomótica intestinal (TURNER *et al.*, 2011).

Apesar das células T reg favorecerem a evolução da doença esquistossomótica para a fase crônica, elas são responsáveis por impedir que o tecido hepático seja demasiadamente lesado pelas ações citotóxicas de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos (BELKAID; SUN; BOULADOUX, 2006). No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor o papel, tanto das células T reg como das outras linhagens de células T, assim como das citocinas produzidas por elas. Com isto, poderá ser possível entender os mecanismos regulatórios da resposta imune envolvidos na esquistossomose e o papel que as células T reg exercem durante esta parasitose (ABATH *et al.*, 2006; BELKAID, 2007).

2.4.1 Diagnóstico

A esquistossomose pode ser diagnosticada através da história clínica e epidemiológica, de exames laboratoriais e através da ultrassonografia (US). No diagnóstico clínico, além de se levar em conta a fase da doença, é de fundamental importância fazer uma análise detalhada do local de residência do paciente, com a intenção de saber se ele vive ou já viveu em área endêmica para esquistossomose e se já tomou banho de rio, riachos e lagos contaminados (BRASIL, 2008a). Contudo,

mesmo com a presença de quadro clínico e com informações epidemiológicas compatíveis, devido à subjetividade destes critérios e à inconstância dos sintomas, os diagnósticos laboratorial e por imagem podem fornecer elementos seguros para a confirmação da doença (BRASIL, 2008a; REY, 2008).

A pesquisa laboratorial consiste em testes imunológicos ou através da visualização dos ovos do *S. mansoni* em amostras fecais. Dentre os métodos utilizados, destacam-se o exame parasitológico das fezes, utilizando as técnicas de Hoffman (qualitativo) e a de Kato-Katz (quantitativo), a biópsia retal ou hepática, e a detecção de antígenos derivados do parasito na circulação sanguínea ou na urina (DOENHOFF *et al.*, 2004 ; BRASIL, 2008a).

Apesar da identificação dos ovos nas fezes ou no material da biópsia ser um diagnóstico confirmatório, os resultados negativos não devem excluir a possibilidade da doença, uma vez que pacientes na fase crônica ou com infecção leve e de área não endêmica, podem apresentar uma carga parasitária muito pequena e conseqüentemente eliminar poucos ovos nas fezes (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

No entanto, os testes sorológicos nem sempre são confiáveis, uma vez que eles podem apresentar reações cruzadas com outras parasitoses e não ser possível correlacionar seus resultados com carga parasitária. Devido a estes fatores, a visualização microscópica dos ovos do *S. mansoni* nas fezes ainda é o mais largamente utilizado, além de ter um custo baixo (RABELLO, 1997; SMITHERS; DOENHOFF, 1982).

2.4.2 Tratamento

Praziquantel e oxamniquine são as drogas disponíveis no mercado para o tratamento da esquistossomose (CIOLI *et al.*, 2004) por apresentarem baixa toxicidade e poderem ser utilizadas para a maioria dos pacientes com diagnóstico confirmado (BRASIL, 2008a).

Dentre os efeitos colaterais do praziquantel, a diarreia e a dor abdominal são os mais comuns. As reações adversas causadas pelo oxamniquine usualmente são as náuseas, tonturas e as reações urticariformes (BRASIL, 2008a).

Há também relatos de redução das taxas de cura e falha no tratamento, após administração de praziquantel pelos pacientes (BOTROS *et al.*, 2003). Além disso, a existência de espécies resistentes do verme aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas efetivas (PENIDO; COELHO; NELSON, 1999; RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOVSKI-ALMEIDA; LEITE, 2006). Portanto, o desenvolvimento de novos compostos antiparasitários advindos de fontes naturais tem sido cada vez mais estudado (DA SILVA FILHO *et al.*, 2008; PONTIN *et al.*, 2008).

2.5 Comorbidade hepatite C e esquistossomose

2.5.1 Epidemiologia

A associação hepatite C e esquistossomose é comum em países em desenvolvimento como o Brasil, Egito, Etiópia e Sudão (AQUINO *et al.*, 2000; BERTHE *et al.* 2007; EL-KADY *et al.*, 2005; KAMAL *et al.*, 2000a; KAMAL *et al.*, 2000b; MUDAWI *et al.*, 2007a). Na região Nordeste do Brasil, onde a esquistossomose é endêmica (PEREIRA *et al.*, 1995), a comorbidade pode ser encontrada principalmente em pacientes com a forma EHE da esquistossomose (MORAIS, 2007), devido às transfusões sanguíneas necessárias após episódios de sangramentos por conta da ruptura das varizes esofagianas, causados pela hipertensão portal esquistossomótica (RAIA; MIES; ALFIERI, 1991).

Em pacientes com a comorbidade no Egito, a infecção por HCV foi provavelmente adquirida após a infecção pelo *S. mansoni*, devido à terapia anti-esquistossomótica injetável, comum desde 1920 até 1980, na qual se reutilizavam as seringas e agulhas para aplicação de medicamentos em toda a população. As agulhas e as seringas de vidro não eram esterilizadas adequadamente (ANGELICO *et al.*, 1997; EL-SAYED *et al.*, 1997). No Brasil, a principal forma de transmissão do HCV nos pacientes com esquistossomose foi através de transfusões sanguíneas antes de 1993, quando ainda não havia triagem sorológica para HCV dos doadores de sangue nos centros de hematologia e hemoterapia brasileiros (CARRAZZONE *et al.*, 2004; SERUFO *et al.*, 1997).

Além disso, os pacientes com esquistossomose podem se infectar de outras formas, como o uso de drogas ou medicamentos injetáveis, ou outros procedimentos médicos-cirúrgicos, como ligaduras endoscópicas das varizes esofágicas. Especula-se que práticas sexuais sem uso de preservativo e com múltiplos parceiros podem levar à contaminação pelo HCV (HOWE *et al.*, 2005; JITTIWUTIKARN *et al.*, 2006).

Estudos reportaram que os pacientes com a comorbidade apresentam pior curso clínico da hepatite C, com maior incidência de cirrose e CHC, baixa resposta à terapia com interferon- α peguilado e elevada taxa de mortalidade, quando comparados com pacientes apenas infectados pelo HCV (ANGELICO *et al.*, 1997; KAMAL *et al.*, 2001a; PEREIRA *et al.*, 1995).

2.5.2 Imunopatologia da comorbidade

Pacientes com a comorbidade exibem perfil clínico, viral e histológico bem característico, manifestado na maioria das vezes por maior persistência viral, extensas lesões necroinflamatórias e rapidez na progressão da fibrose hepática, visualizada através de biópsias. Além disso, com a evolução mais rápida da hepatite C crônica, danos mais severos ao tecido hepático são observados quando comparados com indivíduos unicamente infectados pelo HCV (ANGELICO *et al.*, 1997; KAMAL *et al.*, 2001a).

Acredita-se que este fato ocorra devido às mudanças no perfil da resposta imunológica quando estas doenças estão associadas. A resposta Th1, muito importante no controle da replicação viral e da evolução da hepatite C (FARID *et al.*, 2005; KAMAL; KHALIFA, 2006), é suprimida pela presença dos antígenos parasitários do *S. mansoni*, que induz fortemente a resposta Th2 (CHEEVER; YAP, 1997; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; KAMAL *et al.*, 2001b). Uma vez suprimida a resposta Th1, o resultado é o aumento da replicação viral e progressão mais rápida da fibrose hepática. Ainda, alguns autores verificaram que quando ocorre essa mudança de perfil durante a fase aguda da hepatite C, pode haver o favorecimento à evolução para a fase crônica desta doença nos pacientes com a comorbidade (ANGELICO *et al.*, 1997; KAMAL *et al.*, 2000a; PEREIRA *et al.*, 1995).

Portanto, suspeita-se que pacientes com a comorbidade provavelmente apresentem resposta imune deficiente contra o HCV, além da polarização do perfil para Th2 e lesões mais intensas no tecido hepático (KAMAL *et al.*, 2001b). No entanto, outros autores afirmam que a esquistossomose não interfere em nada no curso natural da hepatite C, não exercendo qualquer influência na evolução da fibrose em pacientes com a comorbidade (SHIHA; ZALATA, 2002).

Por acreditarem que a progressão da fibrose nesses pacientes ocorra mais rapidamente, Kamal *et al.* (2004) admitem que a associação HCV/*S. mansoni* seja um bom modelo para entendimento da relação da resposta imune e o consequente dano no tecido hepático. Em virtude dos resultados controversos, o papel das células T reg frente à comorbidade hepatite C e esquistossomose constitui um tema novo e ainda pouco explorado na literatura, necessitando de maiores elucidações (YOSHIZAWA *et al.*, 2010; KAMAL *et al.*, 2004).

2.6 Células T regulatórias

Atualmente, são descritas pelo menos dois tipos de células T regs: as T reg naturais (nTreg) e as T reg induzidas (iTreg). As nTreg expressam em sua superfície o receptor de cadeia alfa da IL-2, o CD25⁺, sendo produzidas nos corpúsculos de Hassal no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras (CD4⁺CD25⁺) e representam 5 % das células T CD4⁺ periféricas (BACHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; SAKAGUCHI, 2005; YAGI *et al.*, 2004). Estas células são geradas mediante reconhecimento de antígenos próprios, ligados às moléculas de MHC II, no timo através de receptores de células T (TCR) de alta afinidade com o timócito e são essenciais na supressão de doenças autoimunes (ABBAS; LITCHMAN, 2005; BELKAID, 2006; LOSIKOFF; SELF; GREGORY, 2012).

Além do CD25⁺, as nTreg também expressam outros marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação e na função destas células, entre os quais estão: CLTA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), TNFR-2 (*Tumor necrosis factor receptor-2*) e HLA-DR (*Human leucocyte antigen*). Dentre estes marcadores, o

que parece influenciar diretamente a função das T regs é o CTLA-4 que, quando bloqueado, impede a função supressora destas células (GUPTA; CHANG; SUN, 2008; READ *et al.*, 2006). Há outros receptores descritos nas T reg (CD27, Fas, CD62L, CCR6, CCR7, CCR8 e CD103) que favorecem a migração destas células para o local da inflamação, no entanto estes marcadores são encontrados também em linfócitos T ativados (GUPTA; CHANG; SUN, 2008).

No passado, acreditava-se que a expressão da molécula de superfície CD25⁺ era um requisito essencial para caracterizar as células T regs (FURTADO *et al.*, 2002). No entanto, experimentações em animais deficientes de IL-2, que é uma citocina essencial para a ativação de células T reg naturais e que se liga diretamente na molécula de superfície CD25, mostraram que ao ser administrada esta citocina, as células que antes não eram regulatórias e que não expressavam o fator de transcrição forkhead box P3 (FOXP3), passaram a expressá-lo, quando havia estimulação antigênica e passaram a ter função regulatória (CD4⁺FOXP3⁺), mesmo sem expressar o CD25 (COBBOLD *et al.*, 2004; CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2004).

Dessa forma, ficou demonstrado que as células iTreg não necessitam da expressão de CD25 nem do timo para serem ativadas, no entanto necessitam de alguma estimulação pela IL-2 e por epítomos antigênicos.

As células iTreg são geradas na periferia a partir de células T CD4⁺ *naive* após estímulo antigênico ou em condições tolerogênicas (BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007) e produzem citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β (JONULLEIT; SCHIMIDT, 2003; SAKAGUCHI, 2006). Essas células são essenciais para manter a tolerância imunológica de mucosas, principalmente no intestino, contra antígenos alimentares e microbianos. Além disso, são úteis para o controle de inflamações alérgicas crônicas, como ocorre quando há deposição de ovos de *S. mansoni* neste tecido, que induz a produção de IgE e de histamina, além de considerável resposta alérgica (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFFAILE, 2009).

Ainda, as células iTreg podem ser divididas em vários subtipos: Tr1 (produtora de IL-10), Tr3 (produtora de TGF- β), T CD4⁺FOXP3⁺ (induzidas ou adaptativas), T CD8⁺FOXP3⁺, NK FOXP3⁺ e gama-delta (TANG; BLUESTONE,

2008). No entanto, esta subdivisão não parece ser relevante, visto que as funções destas células são muito semelhantes entre si.

A principal função das células T reg é induzir a supressão de células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destas últimas, sendo importantes no controle da resposta imunológica frente a antígenos próprios e não-próprios (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007; SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008).

A expressão do fator de transcrição FOXP3 é uma característica essencial da linhagem de células T reg, tanto naturais quanto induzidas (SAKAGUCHI *et al.*, 2008; ZHENG; RUDENSKY, 2007) e influencia significativamente no fenótipo e na função destas células (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007).

A importância do gene FOXP3, que se localiza no braço curto do cromossomo X e consiste de 11 exons, foi descoberta quando se observou que indivíduos com mutações gênicas neste fator ou deleção funcional são acometidos por uma síndrome denominada *immunodeficiency polyendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome* (IPEX), que é caracterizada por um conjunto de doenças autoimunes graves, levando o indivíduo a óbito rapidamente, com menos de dois anos de idade (GAMBINERI; TORGERSON; OCHS, 2003; TOGERSON; OCHS, 2007).

A proteína FOXP3⁺ é produzida principalmente por células do timo, do baço e dos linfonodos, particularmente nas células T CD4⁺CD25⁺ (TOGERSON; OCHS, 2007; YAGI *et al.*, 2004) e regula a expressão de genes específicos, como o de IL-2, IFN- γ e o GM-CSF (ABBAS; LICHTMAN 2005). Além disso, aumenta a expressão de CD25⁺ e CTLA-4 (MELO; CARVALHO, 2009).

O RNAm de FOXP3, além de ser expresso por células T CD4⁺CD25⁺ no timo e por células iTreg após estimulação antigênica, também pode ser expresso por alguns timócitos T CD8⁺CD25⁺, mas não no timócito CD25⁻. No entanto, esta população celular é muito pequena e por conta disso, não é muito estudada, pois não parece ter maiores efeitos sobre a imunomodulação de doenças. O FOXP3⁺ não é expresso em células B nem em macrófagos, sendo limitada sua expressão aos linfócitos T (MORGAN *et al.*, 2005).

Na literatura, há discordância se as células T reg naturais e induzidas têm a mesma capacidade imunossupressora e o mesmo mecanismo de ação *in vivo* e *in*

vitro. (ARICHA *et al.*, 2008; CUROTTA DE LAFAILLE *et al.*, 2008; DIPAOLO *et al.*, 2007). Além disso, não há um consenso sobre marcadores específicos fidedignos para cada tipo de T reg para avaliação de sua atividade imunossupressora. O que se sabe é que há um número maior de células T reg induzidas do que naturais, provavelmente por conta da exposição a vários antígenos ao longo da vida, mesmo sem a doença em curso (CUROTTA DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

Os mecanismos de ação das T regs para exercerem sua função supressora ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, os mais estudados são (SHEVACH, 2009):

- a) Secreção de citocinas supressoras (IL-10, TGF- β , IL-35) e que inibem diretamente a ação de células T efetoras;
- b) A elevada expressão de CD25⁺ nas nTreg, que é um receptor da cadeia α de IL-2 e que se liga diretamente com essa citocina, competindo com as células T efetoras pelo sítio de ligação e dessa forma, leva à inibição da função e apoptose dessas últimas;
- c) Expressão de moléculas inibitórias de superfície, como a Galectina-1, que se ligam diretamente em linfócitos efetores e param sua maturação e ativação, assim como seu ciclo celular;
- d) As células T reg ativadas possuem ação citotóxica semelhante aos linfócitos T CD8⁺ e diretamente eliminam as células efetoras através da ligação de moléculas de Granzima A ou B com a célula efetora, levando-a a apoptose.

Ainda, as células T reg suprimem as funções das APCs através da ligação de moléculas de superfície como CTLA-4, LAG-3, CD-39, Nrp-1, que inibem a maturação e a apresentação de antígenos pelas células dendríticas (SHEVACH, 2009).

De acordo com a literatura, o TGF- β possui função supressora sobre os linfócitos T efetores e modula a expressão de FOXP3⁺ pelas T reg. A citocina IL-10 inibe a ação das APCs e é antagonista do IFN- γ , sendo relacionada a reações imunes para o controle da inflamação nos tecidos alvos (SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008).

No entanto, as diferenças de funções entre as duas subpopulações não está bem definida até o momento. Vários autores afirmam que as células iTreg são necessárias para conter graves inflamações teciduais e manter a tolerância de mucosas, principalmente na mucosa intestinal. Ainda, as iTreg suprimem a resposta imune e alergias contra alimentos e as respostas inflamatórias contra tumores e em transplantes, além de conter inflamações crônicas causadas por microorganismos. Por outro lado, a principal função das células nTreg é prevenir a autoimunidade e conter a ativação desenfreada da resposta imune sistêmica, seja inata ou adaptativa. (BILLERBECK; BÖTTLER; THIMME, 2007; CUROTTO DE LAFAILLE; LAFFAILE, 2009; LOSIKOFF; SELF; GREGORY, 2012).

Portanto, mais estudos sobre as células T regulatórias e sua influência em enfermidades importantes para o cenário de saúde pública brasileiro, como a esquistossomose e a hepatite C, são necessários para elucidar os mecanismos imunopatológicos e com isso, auxiliar no desenvolvimento imunoterapias e vacinas.

3 JUSTIFICATIVA

A hepatite C e a esquistossomose são, atualmente, grandes problemas de saúde pública do Brasil e do mundo. Embora com diferentes formas de transmissão, são doenças de caráter crônico, que acometem o tecido hepático e que, em regiões como o Nordeste brasileiro, podem ser encontradas associadas no mesmo indivíduo com frequência. Quando essa associação acontece, a lesão hepática provocada pelo HCV tende a evoluir mais rapidamente para cirrose e carcinoma hepatocelular, aumentando significativamente as taxas de morbi-mortalidade da doença, podendo levar o paciente a óbito em poucos anos.

Recentemente, foi identificado que um grupo de células do sistema imune, chamado células T regulatórias, pode ser responsável pela imunomodulação e supressão da resposta imune efetora das células T CD4⁺ e CD8⁺ e apresentar efeito protetor do tecido hepático, quando o paciente apresenta infecção pelo HCV ou *Schistosoma mansoni* ou sua associação. As células T reg são normalmente produzidas quando há estímulo antigênico e um maior percentual destas células pode estar associado à menor morbidade da doença.

Por existir carência na literatura e para gerar conhecimento sobre o efeito supressor das células T reg tanto na hepatite C quanto na esquistossomose, e principalmente na comorbidade, é que a avaliação dessas células torna-se importante para o entendimento da imunopatologia dessas enfermidades.

Com isso, os resultados obtidos a partir desse estudo poderão auxiliar no desenvolvimento de imunoterapia e vacinas e de marcadores de grau/padrão de fibrose, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com doenças infecciosas hepáticas crônicas. Além disso, pode servir de ferramenta auxiliar no controle da evolução para as formas mais graves da hepatite C e da esquistossomose.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o perfil de células T regulatórias em pacientes com hepatite C, com esquistossomose e na comorbidade.

4.2 Específicos

- a) Caracterizar os três grupos de pacientes quanto aos aspectos epidemiológicos.
- b) Determinar os padrões de fibrose hepática nos pacientes com esquistossomose e com a comorbidade através da ultrassonografia de abdômen.
- c) Determinar os graus de fibrose hepática e a atividade inflamatória nos pacientes com hepatite C e com a comorbidade através da análise histopatológica das biópsias hepáticas.
- d) Descrever o perfil de células T regulatórias de sangue periférico nos grupos estudados.
- e) Associar o perfil de células T regulatórias com os diferentes graus/padrões de fibrose hepática em cada grupo estudado.
- f) Comparar o perfil de células T regulatórias entre os grupos com a doença isolada e o grupo comorbidade, associando aos graus/padrões de fibrose hepática.
- g) Determinar os níveis plasmáticos das citocinas IL-10 e TGF- β e associá-los aos graus/padrões de fibrose hepática.
- h) Verificar a expressão gênica relativa de FOXP3 em leucócitos de sangue periférico nos grupos estudados e compará-los entre si.

5 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a relação entre o percentual de células T regulatórias periféricas, a expressão gênica de FOXP3 e os níveis de citocinas IL-10 e TGF- β com o grau/padrão de fibrose hepática encontrado em pacientes com hepatite C, com esquistossomose e na comorbidade?

6 METODOLOGIA

6.1 População estudada

Foram selecionados no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no período de agosto de 2010 a março de 2012, 61 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos.

Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa no momento da consulta clínica, após a anamnese, análise dos prontuários e verificação dos resultados de exames clínicos e laboratoriais. Os indivíduos que aceitaram participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e foram classificados em três grupos de doenças, de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

I- Grupo Hepatite C (HCV; n = 25): pacientes com infecção confirmada através da detecção de anticorpos anti-HCV no soro e do RNA viral e/ou genotipagem por PCR, com biópsia hepática compatível com infecção pelo HCV (no máximo um ano até a coleta do sangue) e com ausência de infecção por *S. mansoni* (com dados parasitológicos e epidemiológicos ausentes). Além disso, os pacientes não estavam em tratamento para hepatite C.

II- Grupo esquistossomose (n = 22): pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (EHE), confirmada através de ultrassonografia de abdômen, histórico de banho de rio, parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni* documentado no prontuário e com anti-HCV negativo.

III- Grupo Comorbidade (CM; n = 14): pacientes acometidos por ambas as doenças, confirmadas através dos mesmos critérios empregados para definir os grupos I e II, sem outra doença em curso que acometa diretamente o sistema imunológico ou o tecido hepático.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram relacionados à ocorrência de: carcinoma hepatocelular (CHC) ou outra hepatopatia, doença renal crônica, doença cardíaca, doença autoimune, diabetes tipo 1, infecção por vírus HIV ou *hepatitis B virus* (HBV), pacientes transplantados ou esplenectomizados, pacientes em uso de

medicamentos imunossupressores, pacientes em uso de corticóides por mais de 10 dias consecutivos e indivíduos com histórico recente de consumo de bebidas alcoólicas, sendo acima de 70 g de etanol por semana (O'CONNOR, 2009).

Os exames laboratoriais anti-HCV, HCV RNA PCR qualitativa e quantitativa e genotipagem foram realizados no LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco e estes exames fazem parte da rotina de acompanhamento dos pacientes no serviço de saúde do ambulatório de gastroenterologia do HC. A ultrassonografia de abdômen, a biópsia hepática e o exame clínico para classificação e inserção dos indivíduos nos grupos da pesquisa foram realizados no HC, por equipe médica especializada, e os resultados desses exames, incluindo o parasitológico de fezes, foram coletados dos prontuários de cada paciente.

A biópsia hepática (grupos hepatite C e comorbidade) foi analisada no serviço de anatomia patológica do HC e foi avaliada através do estudo histopatológico do grau de fibrose e atividade inflamatória, de acordo com a classificação METAVIR (THE METAVIR COOPERATIVE GROUP, 1994). Portanto, o grau de fibrose hepática pode ser de quatro tipos (F1 a F4), sendo F0 = sem fibrose; F1= fibrose portal sem septos; F2 = fibrose portal com poucos septos; F3 = fibrose portal com numerosos septos sem cirrose e F4 = cirrose. A atividade inflamatória, isto é, a medida da intensidade do processo necroinflamatório no tecido hepático, é classificada em quatro situações: A0 = sem atividade inflamatória; A1 = atividade inflamatória leve; A2 = atividade inflamatória moderada; A3= atividade inflamatória severa.

A fibrose periportal dos pacientes com esquistossomose e aqueles com a comorbidade foi avaliada através de exame ultrassonográfico por um único examinador, utilizando a classificação de Niamey (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1996), que caracteriza os graus de fibrose em 6 padrões, que vão do A (ausência) ao F (mais grave). São eles: A- ausência de fibrose, B- fibrose duvidosa, C- fibrose periférica, D- fibrose central, E- fibrose avançada e F- fibrose muito avançada.

Além disso, amostras de sangue de cinco indivíduos saudáveis, sem nenhuma das duas doenças nem outra patologia aparente, foram utilizadas para padronização das técnicas laboratoriais utilizadas neste projeto.

Também foram preenchidos questionários com os dados epidemiológicos de cada paciente, através de entrevista oral, e com os dados clínicos, coletados do prontuário médico, para caracterização dos grupos. Todas as informações foram inseridas em um banco de dados da pesquisa. Esse banco de dados é composto por variáveis qualitativas (sexo, tipo de patologia e forma clínica, dados epidemiológicos, resultado de exames laboratoriais – positivo/negativo e graus/padrões de fibrose hepática) e quantitativas (idade, tempo de infecção, resultados relativos das análises das amostras para quantificação de células T regulatórias através de citometria de fluxo, dosagem de citocinas, expressão relativa de FOXP3, além de dados complementares como a carga viral para HCV).

6.2 Coleta de sangue

Neste projeto, foram coletados 30 ml de sangue venoso com heparina (10 U/ml) dos pacientes participantes da pesquisa. A coleta foi feita no momento da consulta, no HC, por um técnico do CPqAM treinado para esse procedimento, em presença do médico responsável. Dessa amostra, 25 ml foram destinados à realização da quantificação de células T regulatórias através de citometria de fluxo e à verificação da presença de RNAm para o marcador FOXP3 através de PCR em tempo real. Os 5 ml restantes foram utilizados para a dosagem dos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β . A separação dos leucócitos mononucleares periféricos (PBMCs), para posterior análise por citometria de fluxo e PCR em tempo real, foi realizada através da técnica de gradiente de densidade Ficoll-Hypaque modificada (COLIGAN, 2002), descrita abaixo. As dosagens das citocinas foram realizadas no plasma, obtido após centrifugação a 900 x g, por 15 min.

6.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Após a punção venosa, as amostras de sangue foram levadas ao laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do CPqAM-Fiocruz e a cada amostra foi adicionado tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril, na proporção 1:2 em tubo do tipo Falcon de 50 ml.

Após esse procedimento, o sangue foi transferido lentamente para um novo tubo Falcon contendo 10 ml de Ficoll-Hypaque e logo em seguida foi centrifugado a 900 x g por 30 min. Como resultado da centrifugação, quatro fases puderam ser identificadas no tubo: o plasma, o anel de PBMCs, o Ficoll-Hypaque, e o sedimento hemático e os granulócitos. Com o auxílio de uma pipeta estéril, os anéis de PBMCs foram transferidos para outros dois tubos Falcon de 50 ml, onde as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS estéril, seguidas de centrifugação, por 15 min a 300 x g. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso com 2 ml de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 completo, suplementado com 2mM de L-glutamina, 25 M HEPES, 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino inativado a 37 °C.

6.4 Fenotipagem celular *ex vivo* e citometria de fluxo

A viabilidade celular foi verificada através da contagem de leucócitos em câmara de Neubauer, utilizando o corante supravital Trypan-Blue. Em seguida, foi transferido para os 5 tubos de citometria, o equivalente a 10⁶ células por tubo. Cada tubo foi identificado de acordo com marcação a ser realizada: SM (sem marcação), CD4⁺ (marcação apenas para a molécula de superfície CD4), CD25⁺ (marcação apenas para CD25), FOXP3⁺ (marcação intracelular para FOXP3) e Tripla (marcação para CD4, CD25 e FOXP3). Neste momento, também foram armazenadas em 1 ml de Trizol, cerca de 10⁶ células e congeladas a -70°C para posterior utilização na técnica de PCR em tempo real.

O objetivo do tubo SM foi a otimização do citômetro de fluxo antes da compensação do equipamento para a leitura das amostras marcadas, evitando

interferências no resultado causadas por ligações de moléculas inespecíficas na superfície dos PBMCs.

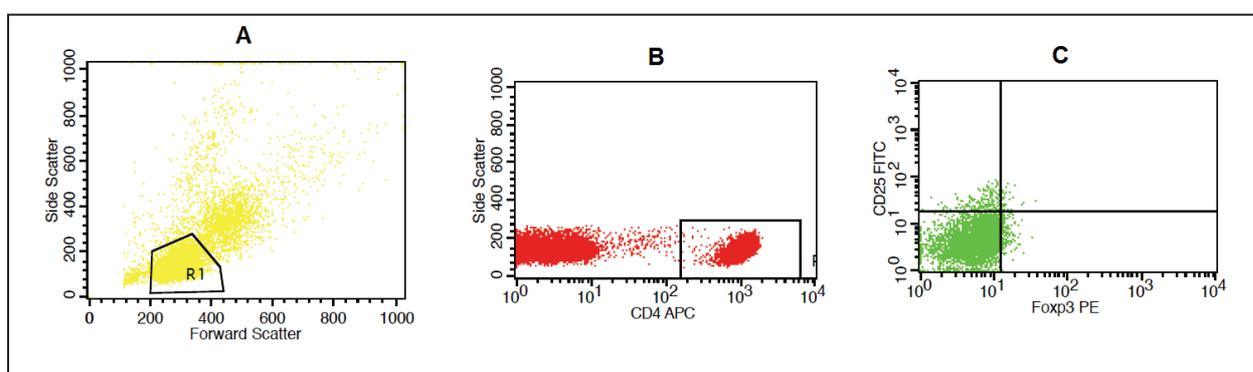
Após a adição das células nos tubos de citometria, procedeu-se a lavagem com 2 ml da solução salina PBS-*Wash* (1% de azida sódica e 5% de Albumina Bovina Sérica - BSA), seguida de centrifugação a 400 x g por 5 min, com descarte do sobrenadante. Após a lavagem das células, foram realizadas as marcações dos receptores de superfície CD4⁺ e CD25⁺, ao abrigo da luz, utilizando a câmara de fluxo laminar esterilizada com ultravioleta (UV). As amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente (TA), também ao abrigo da luz. Após a incubação, foram adicionados 500 µl de paraformaldeído a 1% em cada tubo, para fixação dos anticorpos monoclonais e conservação da integridade celular, seguida de uma incubação por 15 min em TA. Após esta etapa, foram adicionados 2 ml de PBS-*Wash* para lavagem celular, e os tubos centrifugados a 400 x g por 5 min, descartando-se novamente o sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionados 500 µl de solução fixadora/permeabilizante do kit PCH101 anti-FOXP3 humano conjugado a ficoeritrina, para permitir a marcação de FOXP3⁺ intracitoplasmático. As amostras foram então incubadas por 60 min a 4°C, no escuro. Depois, foram realizadas duas lavagens com 1 ml da solução tampão de permeabilização 1X, preparada a partir de uma solução estoque 10X concentrada e os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado a cada lavagem e em seguida, foi realizada a marcação intracitoplasmática do FOXP3⁺. As amostras foram incubadas por 30 min a 4°C, ao abrigo da luz. Novamente foram realizadas duas lavagens com o tampão de permeabilização e centrifugação a 300 x g por 5 min. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* de PBMCs foi ressuspensionado em 300 µl de PBS resfriado estéril, pH 7,2 para leitura imediata no citômetro de fluxo.

Os anticorpos monoclonais de marcação de superfície celular foram obtidos comercialmente da *BD-Biosciences Pharmingen – Ambriex*, sendo eles: clone SK3 anti-CD4⁺ humano conjugado a alofococianina (APC; Cat. Nº: 340443) e clone M-A251 anti CD-25⁺ humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC; Cat. Nº: 555431). O *kit* PCH101 anti-FOXP3 humano conjugado a ficoeritrina (PE; Cat. Nº: 72-5776) para marcação intracitoplasmática de FOXP3⁺ foi obtido da *e-Bioscience*.

A leitura das amostras e a análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo *FACS Calibur*, utilizando o software *Cell Quest Pro* (*BD Biosciences*) em um computador interligado ao equipamento.

A interpretação da aquisição das amostras no citômetro de fluxo foi realizada através de quantificação relativa, na qual 20.000 eventos (células) foram analisados e destes, foi extraído o percentual de T reg com marcadores CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3⁺ (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico ilustrativo de citometria de fluxo realizada neste estudo.



Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: **A** – R1: Região de linfócitos da população de PBMCs; **B** – População de linfócitos com marcação CD4⁺; **C** – População de linfócitos CD4⁺ com marcação CD25⁺ (quadrante superior esquerdo), FOXP3⁺ (quadrante inferior direito) e tripla (quadrante superior direito).

6.5 Avaliação dos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β

As citocinas IL-10 e TGF- β foram dosadas utilizando amostras de plasma, através de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando os kits *Quantikine*, da *R&D Systems* (cód. D1000B e DB100B, respectivamente), para cada citocina específica e seguindo as instruções do fabricante.

Placas de poliestireno com 96 poços, pré-sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-IL-10 ou anti-TGF- β , foram utilizadas como suporte sólido da reação. Os padrões das citocinas foram preparados a partir da reconstituição com 1 ml de água destilada para IL-10 ou com 2 ml do diluente calibrador RD5-53 (1x) para TGF- β . Foi realizada uma diluição seriada destes padrões com concentrações iniciais de 500 pg/ml e 2.000 pg/ml para IL-10 e TGF- β até a concentração mínima de 7,8 pg/ml e 31,2 pg/ml, respectivamente. A diluição seriada foi necessária para

realização da curva padrão e interpolação dos resultados das amostras. Para a dosagem de TGF- β , as amostras de plasma (40 μ l) foram ativadas utilizando solução de 1 N HCl (20 μ l) e neutralizadas com 20 μ l de 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt], antes de proceder a reação de ELISA, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A ativação das amostras para esta citocina foi necessária para que a forma latente do TGF- β pudesse ser transformada em sua forma imunorreativa, aumentando consideravelmente a sensibilidade do teste. As reações ocorreram em duplicata e dois poços contendo apenas diluente, sem padrões ou amostras, foram utilizados como controle do *background* da reação em cada placa. As amostras foram utilizadas nas quantidades sugeridas pelas bulas de cada citocina analisada e todas as etapas do ELISA foram realizadas em conformidade com seu protocolo específico. A revelação da reação ocorreu utilizando a solução substrato a base de tetrametilbenzidina (solução B) e peróxido de hidrogênio (solução A), fornecida pelos *kits*. O tempo de revelação para as duas citocinas foi de 30 min, com as placas ao abrigo da luz, em T. A.. A solução de parada da reação utilizada para a citocina IL-10 foi ácido sulfúrico (2 N) e para o TGF- β , o ácido hidrocloreídrico. As sensibilidades de detecção das citocinas IL-10 e TGF- β foram 3,9 pg/ml e 15,4 pg/ml, respectivamente.

A intensidade de cor produzida em cada poço de placa foi mensurada em espectrofotômetro, utilizando comprimento duplo de onda de 450/595 nm.

As leituras e os cálculos das concentrações referentes às dosagens de cada citocina para cada amostra foram feitos através do *software* Microplate Manager, versão 4.0 (BioRad Laboratories).

6.6 Quantificação relativa da expressão gênica de FOXP3, utilizando PCR em tempo real

Para que a quantificação relativa da expressão gênica de FOXP3 pudesse ser realizada, etapas anteriores de extração de RNA (*Ribonucleic acid*) das amostras de PBMCs e transcrição reversa do RNA para DNA complementar (cDNA) necessitaram ser executadas. Cada amostra de PBMCs (10^6 células) foi conservada

em Trizol por no máximo 1 ano, a -70°C , até o momento da extração de RNA. O Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que mantém a integridade do RNA, enquanto lisa as células e degrada seus componentes intracelulares. O protocolo para isolamento do RNA através de Trizol baseia-se em modificações do método de isolamento de RNA total desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987; 2006) e utiliza neste procedimento clorofórmio, para separação das fases polar (RNA), interface (DNA) e apolar (Trizol e restos celulares); isopropanol (para precipitar o RNA) e álcool a 75%, utilizado na lavagem do *pellet* de RNA. Cada tubo contendo amostra de PBMCs conservada em Trizol foi descongelado até atingir a temperatura ambiente e foi adicionado 200 μl de clorofórmio e incubado por 3 min, após leve agitação manual. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 min, a 4°C , para a separação das três fases: aquosa (RNA), interface (DNA) e orgânica (restos celulares). Os sobrenadantes contendo RNA foram transferidos para novos microtubos e foram adicionados 500 μl de isopropanol, para a precipitação do RNA. Os tubos foram incubados por 10 min, em T. A. e ocorreu nova centrifugação (10.000 x g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi centrifugado duas vezes, a 4°C , para lavagem com álcool 75%, durante 5 min, 10.000 x g. Após o último descarte do sobrenadante, o *pellet* de RNA foi submetido à secagem naturalmente, em T.A. por 30 min. Por fim, este *pellet* foi ressuscitado em 30 μl de água DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% livre de RNase (cód. AM9915G; *Applied Biosystems*) e congelado a -70°C até a etapa da transcrição reversa.

Para a conversão de RNA total em cDNA, utilizamos o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor* (cód. 4374966), obtido comercialmente da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os componentes do *kit* são: 1 tubo de RT Buffer 1ml, 1 tubo de 10X RT primers randômicos 1ml, 1 tubo com 200 μl de 25X dNTP mix (100 mM), 2 tubos com 100 μl de Transcriptase Reversa MultiScribe 50U/ μl e 2 tubos de inibidor de RNase com 100 μl . O *kit* permite até 200 reações de transcrição reversa, com um volume final de 20 μl cada. As condições da PCR no termociclador foram: 1ª etapa - 10 min a 25°C ; 2ª etapa - 120 min a 37°C ; 3ª etapa - 5 min a 85°C e 4ª etapa - resfriamento a 4°C , até o momento da retirada do produto de PCR (cDNA) para armazenamento a -70°C para posterior utilização nas reações de PCR em tempo real.

Foi realizada a quantificação relativa da expressão gênica de FOXP3 em cDNA de amostras de pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade. As amostras foram normalizadas com β -actina marcada com VIC-MGB (cód. 4326315E), que foi o controle endógeno da reação. Para a reação de PCR, o protocolo utilizado, além dos primers e sondas, foram aqueles contidos no ensaio *Taq-Man Gene Expression* (cód. 4331182) com marcação FAM-MGB para FOXP3 em humanos (ID: HS00203958_m1) e *TaqMan Universal PCR Master Mix* (cód. 4304437), ambos obtidos comercialmente através da *Applied Biosystems*.

As escolhas do controle endógeno da reação e do controle interno positivo para hepatite C e para esquistossomose, bem como o *template* das amostras, foram realizadas após padronização da reação de PCR em tempo real. Foram utilizadas diluições seriadas de β -actina e de 18S (cód. 4319413E, *Applied Biosystems*) como controles endógenos e também das amostras escolhidas para controles positivos de cada grupo de paciente.

A reação de PCR por poço constou de: 10 μ l de Master Mix + 1 μ l de gene alvo (FOXP3) ou controle endógeno (β -actina) + 1 μ l de amostra cDNA + 8 μ l de água DEPC, totalizando um volume final de 20 μ l por poço de reação.

O volume final da reação para cada amostra analisada foi de 60 μ l, pois foram realizadas em triplicatas, do tipo *single plex* (para aumento da sua eficiência), de acordo com o protocolo sugerido no *kit* do Master Mix.

Para o gene alvo e a para o controle endógeno, foram incluídos três poços para cada reação, sem amostra, chamados de *No Template Control* (NTC), para controle do *background* da reação.

O equipamento utilizado para a reação de PCR em tempo real foi o *ABI Prism 7500*, da *Applied Biosystems*, disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), do CPqAM-Fiocruz. O método de análise dos resultados da qPCR foi o do C_t Comparativo ($\Delta\Delta C_t$), segundo Livak e Schmittgen, 2001.

A expressão de mRNA para FOXP3 de cada amostra foi primeiramente normalizada com o controle endógeno (β -actina), obtendo-se dessa forma o ΔC_t ($\Delta C_t = C_t$ alvo – C_t endógeno). O C_t corresponde ao ponto no gráfico de PCR em tempo real no qual a reação torna-se exponencial para cada um dos genes (alvo ou endógeno). Após a normalização de cada amostra, foi calculado o ΔC_t médio de

cada grupo (hepatite C, esquistossomose e comorbidade), sendo o $\Delta\Delta Ct$ correspondente ao ΔCt médio do grupo com a doença isolada (hepatite C ou esquistossomose) subtraído do ΔCt médio do grupo com a comorbidade. Após o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, este foi aplicado na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se dessa forma a expressão relativa de mRNA para FOXP3 dos grupos com a doença isolada em relação ao grupo comorbidade.

6.7 Desenho epidemiológico do estudo

O presente estudo tem como desenho epidemiológico a classificação de série de casos, com os pacientes selecionados em corte transversal para comparação entre os grupos hepatite C, esquistossomose e comorbidade. As comparações foram feitas entre os três grupos de pacientes para os dados epidemiológicos, para a quantificação de células T reg, para a dosagem de citocinas e a expressão gênica de FOXP3.

Os pacientes com hepatite C e com a comorbidade foram subdivididos dentro de cada grupo em duas categorias de acordo com o grau das lesões histológicas: 1) sem fibrose significativa ou leve (F0 e F1) e 2) com fibrose significativa ou severa (F2, F3 e F4) de acordo com a classificação METAVIR. Esses pacientes também foram subdivididos em dois grupos de acordo com o grau de atividade inflamatória: 1) inflamação ausente ou leve (A0 e A1) e 2) inflamação moderada ou intensa (A2 e A3).

Em relação aos pacientes com EHE e também ao grupo comorbidade, a divisão em subgrupos ocorreu de acordo com a classificação de Niamey (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1996), em padrões de fibrose D e E/F. O padrão D foi considerado como fibrose moderada e os padrões E e F formaram um subgrupo de pacientes com fibrose avançada.

Foram realizadas associações entre o perfil de células T reg e os graus/padrões de fibrose intragrupo para cada grupo de pacientes. Ainda, foram realizadas comparações intergrupo (entre os pacientes com hepatite C ou EHE e o grupo comorbidade) em relação ao perfil de células T reg ou aos níveis de citocinas, associados aos graus/padrões de fibrose específicos.

6.8 Análise estatística

Para verificar a suposição de normalidade dos resultados obtidos e a homogeneidade das variâncias (homocedasticidade), foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Dependendo da natureza da distribuição das variáveis, testes paramétricos ou não paramétricos foram utilizados para melhor eficiência na análise dos dados. Para a análise comparativa da quantificação relativa das células T reg circulantes ou da dosagem de citocinas entre dois grupos e seus padrões de fibrose, foram aplicados os testes t-Student ou de Mann-Whitney.

Para comparar os três grupos de estudo entre si em relação à quantificação de células T reg naturais, induzidas e totais ou em relação à expressão gênica de FOXP3, foram utilizados os testes de Análise de Variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis. Para testar as comparações múltiplas entre os subgrupos, foi utilizado o teste Least Square Deviance (LSD). Nos casos de ausência de homocedasticidade, foi utilizado o teste de Tamhane. Ainda, para analisar o risco relativo em relação aos fatores epidemiológicos foi utilizada a Odds Ratio (OR). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados para análise estatística foram o SPSS, versão 16.0 e o Stata, versão 12.0.

6.9 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, sob o número de registro 0018.0.000.095-09.

O projeto teve financiamento do edital Universal CNPq n° 472461/2010-9 e foi desenvolvido utilizando a estrutura física, equipamentos e insumos do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM), do Laboratório de Imunogenética, ambos do Departamento de Imunologia e do Núcleo Integrado de Plataformas Tecnológicas (NPT), CPqAM/FIOCRUZ.

7 RESULTADOS

7.1 Dados epidemiológicos

De acordo com resultados deste trabalho, a média de idade dos pacientes com hepatite C, com esquistossomose ou com a comorbidade foi maior que 48 anos. Mais da metade dos pacientes foi do sexo feminino nos três grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes quanto à idade e ao sexo.

Características	Grupos (n = 61)		
	EHE	HCV	CM
n (%)	22 (36,0)	25 (41,0)	14 (23,0)
Idade em anos (média ± DP)	48,6 ± 10,2	49 ± 12,2	57,7 ± 6,7
Sexo n (%)			
M (n = 23)	7 (31,8)	12 (48,0)	4 (28,5)
F (n = 38)	15 (68,2)	13 (52,0)	10 (71,5)

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: EHE – Esquistossomose hepatoesplênica; HC – Hepatite C; CM – Comorbidade; n – número de indivíduos estudados; DP – desvio padrão; M – Masculino; F – Feminino.

Em relação ao fator idade, houve diferença estatística entre as médias quando comparados os grupos esquistossomose e comorbidade (OR = 0,891; IC = 0,806- 0,984; $p < 0,023$) e hepatite C e comorbidade (OR = 0,886; IC = 0,802- 0,978; $p < 0,017$), indicando que a comorbidade ocorreu em pacientes com idade mais avançada. No entanto, quando foi comparada a média de idade dos grupos hepatite C e esquistossomose, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$).

As características epidemiológicas dos pacientes do presente estudo quanto aos fatores de risco para infecção por *S. Mansoni* e/ou HCV estão descritas na Tabela 2.

Para a transmissão da esquistossomose, tanto no grupo com EHE quanto no grupo comorbidade, o fator de risco mais encontrado foi tomar banho de rio, seguido por realização de atividades de lazer no rio, como nado e pesca e ser morador de área rural.

Quanto aos principais fatores de risco para adquirir a infecção pelo HCV, a prática sexual sem uso de preservativo foi o fator mais citado entre os pacientes com hepatite C, seguido de procedimentos odontológicos e internações hospitalares/cirurgia. Já para o grupo com a comorbidade, o fator de risco mais encontrado para a infecção pelo HCV foi internação hospitalar, seguido por procedimentos odontológicos/prática sexual sem preservativo e compartilhamento de seringas.

Quando os fatores de risco foram comparados entre os grupos com a doença isolada e o grupo comorbidade, houve diferença estatística apenas para o item “compartilhamento de seringas” entre os grupos hepatite C e comorbidade ($p < 0,027$), indicando que neste último grupo esta prática foi mais comum.

Tabela 2 - Características dos pacientes quanto aos fatores de risco para infecção por *S. mansoni* e/ou HCV.

			Grupos					
			EHE		HCV		CM	
			SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Fatores de Risco n (%)	<i>S. mansoni</i>	Morador de área rural	18 (81,8)	4 (18,2)	-	-	7 (50)	7 (50)
		Histórico de banho de rio	22 (100)	0	-	-	14 (100)	0
		Atividades de lazer em rios	20 (90,9)	2 (9,1)	-	-	13 (92,9)	1 (7,1)
		Lavagem de roupas em rios	16 (72,7)	6 (27,3)	-	-	6 (42,8)	8 (57,2)
		Presença de saneamento básico	13 (59)	9 (41)	-	-	9 (64,3)	5 (35,7)
		Água encanada na residência	19 (86,3)	3 (13,7)	-	-	12 (85,7)	2 (14,3)
		Presença de banheiro intradomiciliar	19 (86,3)	3 (13,7)	-	-	13 (92,8)	1 (7,2)
		Consumo de água tratada	16 (72,7)	6 (27,3)	-	-	12 (85,7)	2 (14,3)
	HCV	Hemotransusão	-	-	8 (32)	17 (68)	5 (35,7)	9 (64,3)
		Receptor de fator de coagulação antes de 1987	-	-	2 (8)	23 (92)	0	14 (100)
		Hemodiálise	-	-	0	25 (100)	0	14 (100)
		Compartilhamento de seringas	-	-	10 (40)	15 (60)	11 (78,6)	3 (21,4)
Presença de tatuagem ou piercings		-	-	1 (4)	24 (96)	0	14 (100)	
Acupuntura		-	-	0	25 (100)	1 (7,2)	13 (92,8)	
Práticas sexuais sem preservativo		-	-	25 (100)	0	12 (85,7)	2 (14,3)	
Internação hospitalar/cirurgia		-	-	22 (88)	3 (12)	13 (92,8)	1 (7,2)	
Procedimentos Odontológicos		-	-	24 (96)	1 (4)	12 (85,7)	2 (14,3)	
Profissional da área de saúde		-	-	5 (20)	20 (80)	1 (7,2)	13 (92,8)	
Causa desconhecida	-	-	0	25 (100)	0	14 (100)		

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: EHE – Esquistossomose hepatoesplênica; HC – Hepatite C; CM – Comorbidade; n – número de indivíduos estudados; *S. mansoni* – *Schistosoma mansoni*; HCV – *Hepatitis C Virus*.

Dentre os dados referentes ao genótipo do HCV dos 39 pacientes infectados pelo vírus (grupo com hepatite C e com a comorbidade), foi possível

o resgate de 31 resultados de genotipagem, devido à falta de informação no prontuário nos oito restantes. Dos 31 resultados de genótipos de HCV resgatados, 80,7% ($n = 25$) dos pacientes tinham infecção pelo genótipo 1a ou 1b, 16,1% estavam infectados pelo tipo 3 ($n = 5$) e apenas 1 paciente (3,2%) pelo genótipo 2, com diferença estatística significativa entre as prevalências dos genótipos do HCV nesta população ($p < 0,001$).

7.2 Resultados obtidos na quantificação relativa de células T reg por citometria de fluxo

Na Tabela 3 e no Gráfico 1, podem ser observados os resultados referentes à quantificação relativa de células T reg nos três grupos de pacientes, sendo elas comparadas de três formas: a primeira foi através do percentual de células nTreg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$), a segunda representada pelo percentual das iTreg ($CD4^+CD25^-FOXP3^+$) e a terceira considerando-se a soma dos dois percentuais acima, chamada de total de células T reg, considerando 20.000 eventos.

Quando comparadas as médias das quantificações relativas de células nTreg nos três grupos, foi observada diferença estatística significativa ($p = 0,007$). O grupo com EHE apresentou percentual maior de células nTreg quando comparado com o grupo de pacientes com hepatite C ($p = 0,006$) e com o grupo com a comorbidade ($p = 0,036$). Em relação às células iTreg, observou-se diferença estatística entre os grupos com esquistossomose e com a comorbidade ($p = 0,037$). No percentual do total de células T reg, também houve diferença estatística entre estes dois grupos de pacientes ($p = 0,023$).

Tabela 3 - Percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade.

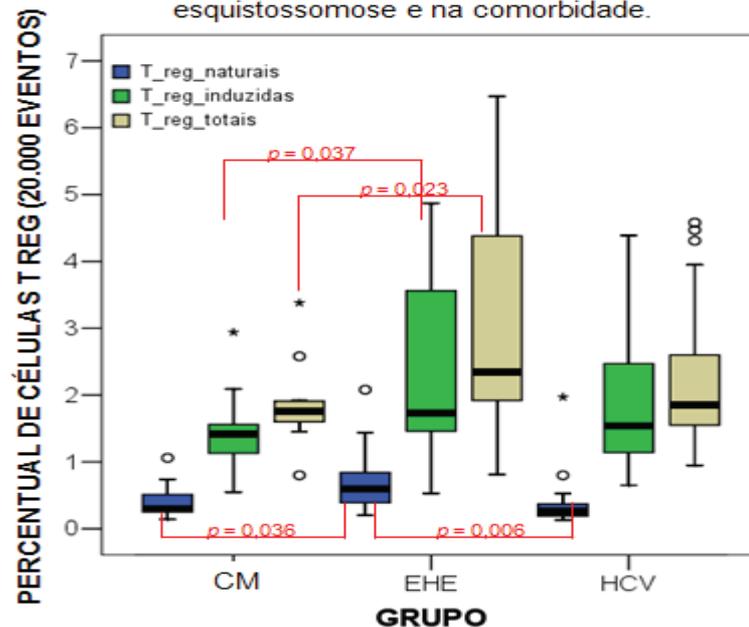
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	p	Sig.	p
T reg naturais%*								
Hepatite C ⁽¹⁾	25	0,13	1,97	0,36	0,37			
Esquistossomose ⁽²⁾	22	0,20	2,08	0,71	0,46	0,007	1x2	0,006
Comorbidade ⁽³⁾	14	0,14	1,06	0,42	0,26		1x3	0,621
							2x3	0,036
T reg induzidas%†								
Hepatite C ⁽¹⁾	25	0,65	4,39	1,87	1,01			
Esquistossomose ⁽²⁾	22	0,53	4,87	2,17	1,21	0,102	1x2	0,352
Comorbidade ⁽³⁾	14	0,55	2,94	1,44	0,57		1x3	0,136
							2x3	0,037
Total T reg %†								
Hepatite C ⁽¹⁾	25	0,95	4,58	2,23	1,10			
Esquistossomose ⁽²⁾	22	0,81	6,47	2,89	1,57	0,036	1x2	0,101
Comorbidade ⁽³⁾	14	0,80	3,38	1,83	0,58		1x3	0,224
							2x3	0,023

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *ANOVA e LSD

† Kruskal-Wallis e Tamhane

Legenda: DP = Desvio-Padrão; Sig = Significante entre; T reg = Células T regulatórias.

Gráfico 1 - Quantificação de células T regulatórias na hepatite C, na esquistossomose e na comorbidade.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: CM = Grupo comorbidade, EHE = Grupo esquistossomose hepatoesplênica, HCV = Grupo hepatite C.

Quando o percentual de células T reg foi associado com o grau de fibrose e com a atividade inflamatória encontrada nos pacientes com hepatite C, nenhuma diferença estatística foi observada entre os subgrupos (Tabelas 4 e 5). Não foi possível o resgate do resultado da biópsia de um paciente (amostra insuficiente para análise).

Tabela 4. Associação entre o percentual de células T regulatórias e os graus de fibrose intragrupo nos pacientes com hepatite C.

(Continua)

Hepatite C	N	Média	DP	p^*
T reg naturais %				
F0 e F1	12	0,27	0,19	0,208
F2, F3 e F4	12	0,47	0,49	
T reg induzidas %				
F0 e F1	12	1,81	0,85	0,861
F2, F3 e F4	12	1,74	1,00	

Tabela 4: Associação entre o percentual de células T regulatórias e os graus de fibrose intragrupo nos pacientes com hepatite C.

				(Conclusão)
Total T reg %				
F0 e F1	12	2,08	0,90	0,770
F2, F3 e F4	12	2,20	1,19	

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *T-Student

Legenda: F0 e F1 = Fibrose ausente e fibrose leve, respectivamente; F2, F3 e F4 = Fibrose moderada, avançada e cirrose, respectivamente; T reg= Células T regulatórias.

Tabela 5. Associação entre o percentual de células T regulatórias e a atividade inflamatória intragrupo nos pacientes com hepatite C.

Hepatite C	N	Média	DP	p*
T reg naturais %				
A0 e A1	15	0,39	0,47	0,666
A2 e A3	9	0,32	0,14	
T reg induzidas %				
A0 e A1	15	1,99	1,04	0,134
A2 e A3	9	1,41	0,52	
Total T reg %				
A0 e A1	15	2,39	1,18	0,085
A2 e A3	9	1,74	0,58	

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *T-Student

Legenda: A0 e A1 = Atividade inflamatória ausente e leve, respectivamente; A2 e A3 = Atividade inflamatória moderada e avançada, respectivamente; T reg = Células T regulatórias.

Quando o subgrupo formado pelos graus de fibrose F2, F3 e F4 e o subgrupo formado pela atividade inflamatória A2 e A3 foram associados à quantidade relativa de células T reg e comparados entre os grupos de pacientes com hepatite C e com a comorbidade, também nenhuma diferença estatística foi observada (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Comparação entre o percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C e com a comorbidade, na associação com o grau de fibrose hepática.

Graus F2, F3 e F4	N	Média	DP	p*
T reg naturais%				
Hepatite C	12	0,47	0,49	
Comorbidade	13	0,39	0,27	0,656
T reg induzidas%				
Hepatite C	12	1,74	1,00	
Comorbidade	13	1,44	0,40	0,635
Total T reg%				
Hepatite C	12	2,20	1,19	
Comorbidade	13	1,71	0,41	0,397

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *T-Student

Legenda: F2, F3 e F4 = Fibrose moderada, avançada e cirrose, respectivamente; T reg = Células T regulatórias.

Tabela 7. Comparação entre o percentual de células T regulatórias em pacientes com hepatite C e com a comorbidade, na associação com a atividade inflamatória.

A2 e A3	N	Média	DP	p*
T reg naturais%				
Hepatite C	9	0,32	0,14	0,644
Comorbidade	12	0,37	0,25	
T reg induzidas%				
Hepatite C	9	1,41	0,52	0,772
Comorbidade	12	1,49	0,60	
Total T reg%				
Hepatite C	9	1,74	0,58	0,670
Comorbidade	12	1,85	0,63	

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *T-Student

Legenda: A2 e A3 = Atividade inflamatória moderada e avançada, respectivamente; T reg = Células T regulatórias.

A Tabela 8 nos mostra a comparação entre o percentual de células T reg e os padrões de fibrose intragrupo observados nos pacientes com esquistossomose. Como os pacientes com EHE e com a comorbidade não apresentam padrões de fibrose leve, eles foram divididos em dois subgrupos, de acordo com a classificação de Niamey: um grupo com moderado grau de fibrose, representado pelo padrão D e outro grupo com padrão de fibrose avançado, representado pelos padrões E e F. Foi observado aumento significativo do percentual de células iTreg ($p = 0,020$), quando os padrões de fibrose, nestes pacientes, foram do tipo E/F. O percentual das células nTreg e o do total de células T reg não se mostraram influenciados pelas variáveis desta análise.

Tabela 8. Associação entre o percentual de células T reg e os padrões de fibrose intragrupo nos pacientes com esquistossomose.

Esquistossomose	N	Média	DP	p*
T reg naturais%				
D	7	0,66	0,44	
E e F	15	0,74	0,49	0,720
T reg induzidas%				
D	7	1,52	0,32	
E e F	15	2,48	1,35	0,020
Total T reg%				
D	7	2,19	0,61	
E e F	15	3,22	1,79	0,060

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *T-Student

Legenda: Padrão D = Fibrose periportal central; Padrão E e F = Fibrose periportal avançada e muito avançada, respectivamente; T reg = Células T regulatórias

Quando a mesma análise foi realizada para o grupo de pacientes com a comorbidade, apenas o percentual de iTreg apresentou diferença estatística ($p = 0,019$) em relação aos padrões de fibrose analisados (Tabela 9), de acordo com a classificação de Niamey.

Tabela 9. Associação entre o percentual de células T reg e os padrões de fibrose intragrupo nos pacientes com a comorbidade.

Comorbidade	N	Média	DP	p^*
T reg naturais%				
D	7	0,48	0,34	
E e F	7	0,35	0,13	0,369
T reg induzidas%				
D	7	1,08	0,33	
E e F	7	1,76	0,58	0,019
Total T reg%				
D	7	1,57	0,37	
E e F	7	2,11	0,65	0,077

Fonte: elaborada pela autora

Nota: *T-Student

Legenda: Padrão D = Fibrose periportal central; Padrão E e F = Fibrose periportal avançada e muito avançada, respectivamente; T reg = Células T regulatórias.

Ao se comparar o percentual de células T reg encontrado no padrão D de fibrose hepática entre os grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade, foi observada maior quantidade relativa dessas células, tanto induzidas ($p = 0,026$) como totais ($p = 0,040$), nos pacientes apenas com esquistossomose (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação entre o percentual de células T reg em pacientes com esquistossomose e com a comorbidade, na associação com o padrão D de fibrose hepática, classificação de Niamey.

Padrão D	N	Média	DP	<i>p</i>*
T reg naturais%				
Esquistossomose	7	0,66	0,44	
Comorbidade	7	0,48	0,34	0,416
T reg induzidas%				
Esquistossomose	7	1,53	0,32	
Comorbidade	7	1,08	0,33	0,026
Total T reg %				
Esquistossomose	7	2,19	0,61	
Comorbidade	7	1,57	0,37	0,040

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *Teste t de Student

Legenda: Padrão D = Fibrose periportal central; T reg = Células T regulatórias

Ao realizar esta análise, desta vez observando os padrões mais severos de fibrose hepática (E e F), houve diferença estatística em relação ao percentual de nTreg ($p = 0,046$), refletindo também em diferença significativa no número relativo de células T reg totais ($p = 0,044$), quando comparados os grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre o percentual de células T reg em pacientes com esquistossomose e com a comorbidade, na associação com os padrões E e F de fibrose hepática, classificação de Niamey.

Padrões E e F	N	Média	DP	$p^{\#}$
T reg naturais%				
Esquistossomose	15	0,74	0,49	
Comorbidade	7	0,35	0,13	0,046
T reg induzidas%				
Esquistossomose	15	2,48	1,35	
Comorbidade	7	1,76	0,58	0,088
Total T reg %				
Esquistossomose	15	3,21	1,79	
Comorbidade	7	2,11	0,65	0,044

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: $^{\#}$ Mann-Whitney

Legenda: Padrão E e F = Fibrose periportal avançada e muito avançada, respectivamente; T reg = Células T regulatórias.

7.3 Resultados obtidos das dosagens de citocinas utilizando ELISA

De acordo com os resultados deste trabalho, houve diferença estatística entre as médias das dosagens das citocinas IL-10 e TGF- β para os três grupos de pacientes estudados (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação das médias das dosagens de citocinas IL-10 e TGF- β entre os grupos de pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade.

Citocinas	Hepatite C (n = 25)	Esquistossomose (n = 22)	Comorbidade (n = 14)	p*
pg/ml	Médias (DP)	Médias (DP)	Médias (DP)	
IL-10	1,78 (4,01)	9,96 (16,83)	5,25 (7,22)	0,016
TGF- β	23.934 (10.210)	14.551 (6.360)	23.303 (17.200)	0,024

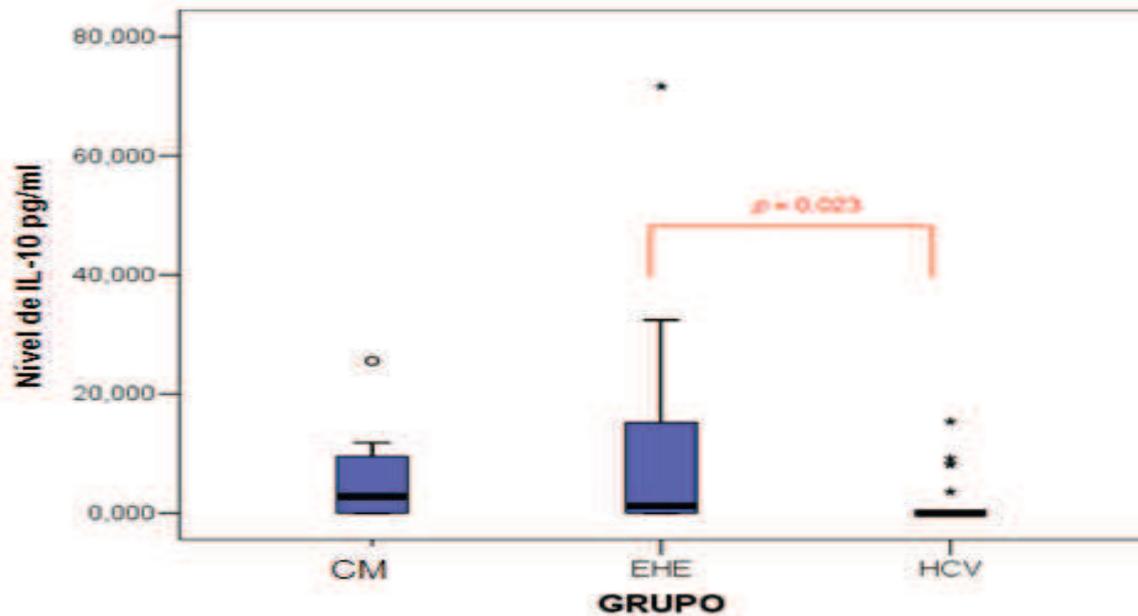
Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *Kruskal-Wallis.

Para identificar entre quais grupos de pacientes os níveis das dosagens de citocinas apresentou diferença estatística, os testes LSD e ANOVA foram aplicados, obtendo-se os seguintes resultados:

- Para a citocina IL-10, houve diferença estatística entre os níveis das dosagens nos grupos de pacientes com hepatite C e com esquistossomose ($p = 0,023$, Gráfico 2), sendo maior neste último grupo.
- Para a citocina TGF- β , houve diferença estatística entre os níveis das dosagens nos grupos com hepatite C e com esquistossomose ($p = 0,001$) e nos grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade ($p = 0,048$, Gráfico 3), sendo menor no grupo com esquistossomose isolada.

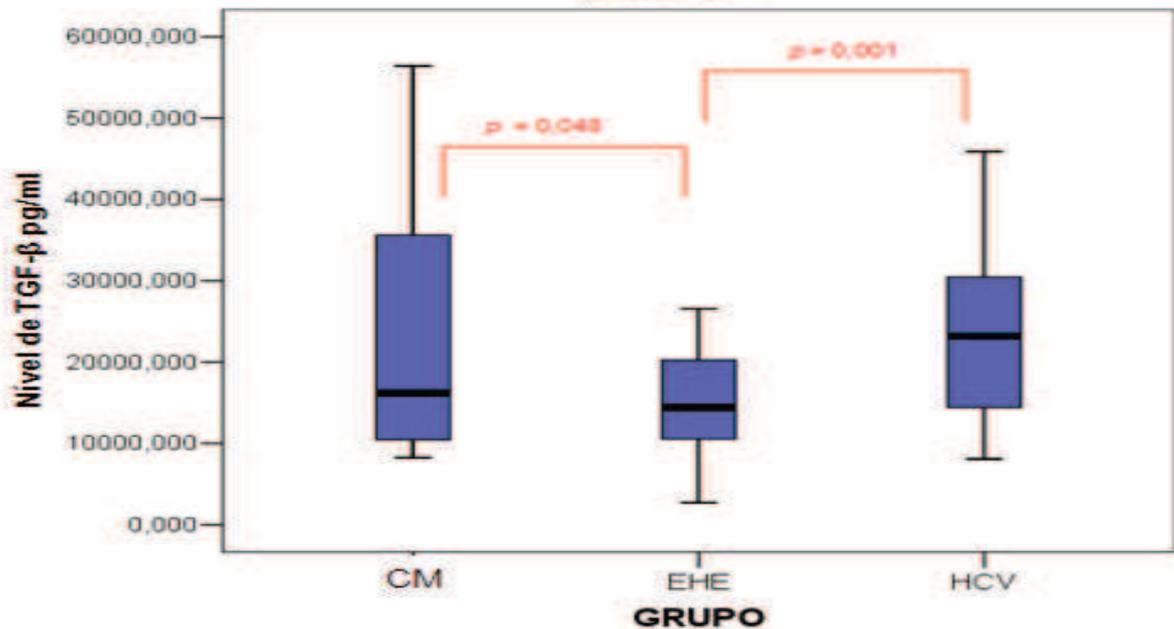
Gráfico 2 - Níveis das dosagens de IL-10 nos três grupos de pacientes.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: CM = Grupo comorbidade, EHE = Grupo esquistossomose hepatoesplênica, HCV = Grupo hepatite C.

Gráfico 3 - Níveis das dosagens de TGF- β nos três grupos de pacientes.



Fonte: autoria própria.

Legenda: CM = Grupo comorbidade, EHE = Grupo esquistossomose hepatoesplênica, HCV = Grupo hepatite C.

Quando os graus de fibrose F2, F3 e F4 foram associados aos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β , houve diferença estatística apenas entre as médias de IL-10 quando comparados os grupos de pacientes com hepatite C e com a comorbidade ($p = 0,027$; Tabela 13). Em relação aos padrões de fibrose E e F, nenhuma diferença estatística foi observada entre as médias de IL-10 e de TGF- β entre os grupos com esquistossomose e com a comorbidade ($p > 0,05$; Tabela 14).

Tabela 13. Comparação das médias das dosagens de IL-10 e TGF- β , em relação aos graus de fibrose F2, F3 e F4, entre os grupos de pacientes com hepatite C e com a comorbidade.

Graus F2, F3 e F4	N	Média	Desvio	p^*
IL-10 pg/ml				
Hepatite C	12	0,98	1,20	
Comorbidade	13	4,92	7,74	0,027
TGF-β pg/ml				
Hepatite C	12	25.492,78	11.886,87	
Comorbidade	13	23.492,28	18.385,22	0,149

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *Mann-Whitney

Tabela 14. Comparação das médias das dosagens de IL-10 e TGF- β , em relação aos padrões de fibrose E e F, entre os grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade.

Padrões E e F	N	Média	Desvio	p^*
IL-10 pg/ml				
Esquistossomose	15	7,83	10,30	
Comorbidade	7	8,23	8,94	0,635
TGF-β pg/ml				
Esquistossomose	15	14.854,02	4.428,07	
Comorbidade	7	15.346,25	9.587,54	0,357

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *Mann-Whitney

7.4 Resultados da expressão gênica relativa de FOXP3, utilizando PCR em tempo real

Quando as médias dos Δ Cts de cada grupo de pacientes, após a normalização com o controle endógeno β -actina, foram comparadas entre si, houve diferença estatística entre os grupos com hepatite C e com a comorbidade ($p < 0,0001$) e entre os grupos com esquistossomose e com a comorbidade ($p < 0,0001$). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos com hepatite C e com esquistossomose (Tabela 15).

Tabela 15. Expressão gênica de FOXP3 em leucócitos periféricos de pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade.

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Média Δ Ct	Desvio	p	Sig.	p^*
Hepatite C	25	0,89	7,81	4,18	1,69		1x2	0,666
Esquistossomose	21 [#]	1,99	6,65	3,99	1,32	0,0001	1x3	0,0001
Comorbidade	14	1,75	8,40	6,28	1,51		2x3	0,0001

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: *ANOVA e LSD.

[#] Uma amostra foi descartada por ter sido contaminada.

Quando foi feita a comparação relativa dos $\Delta\Delta$ Cts ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}) entre os grupos de pacientes com hepatite C e com esquistossomose em relação ao grupo com a comorbidade, foi observada uma expressão gênica de FOXP3 4,27 vezes mais no grupo com hepatite C e 4,89 vezes mais no grupo com esquistossomose quando comparados com a expressão de FOXP3 no grupo comorbidade ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística na expressão gênica de FOXP3 entre os grupos com hepatite C e com esquistossomose ($p > 0,05$).

8 DISCUSSÃO

Este trabalho analisou inicialmente o perfil epidemiológico dos pacientes com hepatite C, com esquistossomose e com a comorbidade, em relação à média de idade, o sexo, o genótipo do HCV em pacientes infectados pelos vírus, além dos principais fatores de risco para as doenças em cada grupo.

Em relação ao estudo da imunopatologia dessas doenças, a avaliação do perfil de células T regulatórias foi importante para verificar se houve relação entre o percentual aumentado de T reg ou dos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β (também produzidas por essas células) com menor grau/padrão de fibrose, o que indicaria um possível efeito protetor ao tecido hepático. A expressão gênica de FOXP3 analisada neste estudo verifica se as células T reg estão com sua função supressora ativada.

De acordo com os resultados obtidos sobre o perfil epidemiológico dos pacientes (Tabela 1), o fator idade mostrou-se com diferença significativa quando comparadas as médias entre os três grupos de pacientes, sendo mais avançada no grupo comorbidade. Isto indica que a idade mais avançada pode influenciar no risco de adquirir a infecção por HCV entre os indivíduos com esquistossomose hepatoesplênica, corroborando com estudos de Meira *et al.*, (1999) e Silva *et al.* (2008). Este último trabalho mostrou que a média de idade encontrada entre os pacientes com a comorbidade foi de 55 ± 12 anos (com 71% acima dos 50 anos), sendo muito semelhante a média de idade para este grupo no presente estudo, que foi de $57,7 \pm 6,7$ anos.

Em relação aos pacientes com esquistossomose e com hepatite C, a média de idade encontrada nestes grupos ($48,6 \pm 10,2$ e $49 \pm 12,2$ anos, respectivamente) foi semelhante às médias encontradas nos grupos com estas enfermidades em outros trabalhos (AQUINO *et al.*, 2000; KAMAL *et al.*, 2000a; LACERDA *et al.*, 1993 ; MOURÃO *et al.*, 2008 ; MUDAWI *et al.*, 2007a, 2007b).

Quando foi analisada a variável sexo, surpreendentemente a grande maioria dos pacientes eram do sexo feminino nos grupos com EHE e com a comorbidade (68,2% e 71,5% respectivamente), contrariando dados dos estudos de Pereira *et al.*, (2001) e Mudawi *et al.*, (2007b), que afirmam que a maioria dos pacientes com a comorbidade são do sexo masculino, acima dos 50 anos. Ainda, em relação ao

grupo EHE, estes autores afirmam que a predominância masculina entre os pacientes se deve ao fato que os homens estão mais expostos à infecção por *S. mansoni*, devido ao trabalho em lavouras e à pesca em rios contaminados por cercárias.

No presente estudo, a predominância do sexo feminino pode estar relacionada aos critérios de exclusão adotados. Um dos critérios que foi responsável pela exclusão da maioria dos pacientes foi o consumo moderado e/ou frequente de etanol, que costuma ser mais comum na população masculina (O'CONNOR, 2009), provocando um viés na categoria sexo. No entanto, com os critérios de exclusão selecionados, houve a obtenção de resultados fidedignos sobre as amostras coletadas, visto que o excesso de etanol prejudica as funções imunológicas (Pereira *et al.*, 1995).

Outra explicação para o fato de maioria dos pacientes esquistossomóticos provenientes de hospitais serem do sexo feminino, segundo Resendes, Souza-Santos e Barbosa (2005), é que as mulheres normalmente demonstram um cuidado maior com a saúde e procuram mais frequentemente serviços ambulatoriais especializados. Embora haja resultados discordantes na literatura, Lacerda *et al.* (1993) e Silva *et al.* (2011) corroboram com os resultados deste trabalho quando foi encontrada que a maioria dos pacientes com essas enfermidades são do sexo feminino.

O grupo de pacientes com hepatite C, nesta pesquisa, mostrou-se bem equilibrado em relação à variável sexo, com 52% de mulheres e 48% de homens, indo de encontro aos resultados obtidos por Mourão *et al.* (2008), nos quais 2/3 dos indivíduos que tinham hepatite C crônica eram do sexo masculino.

Em relação ao genótipo, Campiotto *et al.* (2005) verificaram que a prevalência do genótipo 1 do HCV no Brasil é de 64,9%, seguida pelo genótipo 3, com 30,2% dos infectados. Na região Nordeste, a prevalência do genótipo 1 é de 66,7%, sendo que em Pernambuco, este genótipo atinge 60,7% da população infectada. No presente estudo, 80,7% dos indivíduos infectados pelo HCV apresentaram o genótipo 1, sendo maior do que o percentual encontrado para o estado de PE no trabalho destes autores. O genótipo 1, especialmente o 1b, costuma ser mais agressivo ao tecido hepático e provavelmente pode levar os pacientes a procurarem

serviços ambulatoriais mais frequentemente devido às queixas clínicas (FERREIRA; SILVEIRA, 2001).

Em relação aos fatores de risco, a transmissão do vírus da hepatite C ocorre principalmente através de sangue contaminado. Algumas situações são consideradas de risco para adquirir a infecção por este vírus e são encontradas entre hemofílicos, usuários de medicamentos e/ou drogas injetáveis e pacientes submetidos à diálise renal (NAGHETTINI *et al.*, 1997).

No entanto, quando foram analisados os principais fatores de risco para adquirir a infecção pelo HCV no grupo com hepatite C, a prática sexual sem uso de preservativo apareceu como sendo o fator mais prevalente (100%) neste estudo, seguido de procedimentos odontológicos e internações hospitalares/cirurgia. Fatores importantes como compartilhamento de seringas e hemotransusão antes de 1993 ocorreram em 40% e 38% dos pacientes, respectivamente.

Relacionando a contaminação pelo HCV através da via sexual, o estudo de Diament (2007) aponta esta via como um fator de risco importante para adquirir o vírus, ocorrendo em 10% dos casos nos pacientes diagnosticados como HCV positivos em seu estudo. Porém, este número está bem abaixo do percentual encontrado neste trabalho. Vale salientar que a prática sexual sem uso de preservativo citada por 100% dos pacientes com hepatite C nesta pesquisa não é garantia de que a infecção pelo HCV aconteceu estritamente desta forma, visto que viés de memória sobre a história pessoal de cada paciente deve ser considerado como um fator de confusão para determinação de outros possíveis fatores de risco. Além disso, esta via de contaminação ainda continua controversa na literatura (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; MOURÃO *et al.*, 2008; THOMPSON; FINCH, 2005).

Diament (2007) afirma que a reutilização de seringas para aplicação de medicamentos pode ser considerado um importante fator de risco na transmissão do HCV. Em relação ao compartilhamento de seringas para o uso de medicamentos e/ou drogas injetáveis, este fator de risco ocupou somente o 4º lugar na prevalência entre os pacientes com hepatite C no presente trabalho. No entanto, ele foi significativo ao se comparar com os pacientes do grupo comorbidade, no qual foi relatado o uso de seringas de vidro por 78,6% dos indivíduos.

Estes resultados divergentes indicam que as formas de contaminação com HCV ainda não estão totalmente elucidadas, variando entre as regiões do Brasil e por isso mais estudos epidemiológicos sobre os fatores de risco são necessários.

Por outro lado, os fatores de risco para adquirir esquistossomose já estão bem elucidados na literatura. O banho de rio ou contato com água contaminada por cercárias em poças, açudes, lagoas (ARAÚJO *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2004; REY, 2008) é responsável por praticamente todos os casos da doença. O que varia é a atividade realizada neste ambiente (lavagem de roupa, banho, pesca, agricultura) e a idade da população infectada, principalmente quando a área é endêmica, com a primo-infecção se dando, na maioria das vezes, no início da infância (FAVRE *et al.*, 2001; REY, 2008).

De acordo com os resultados obtidos, o banho de rio foi confirmado por 100% dos casos de esquistossomose, nos grupos de pacientes com EHE e com a comorbidade. O rio era utilizado por estes indivíduos principalmente para nadar e pescar. Um fator de risco importante é ter sido morador de área rural, o que confirma a falta de medidas de prevenção e controle da esquistossomose nestas áreas, além de um saneamento básico eficiente (ABATH *et al.*, 2006; FAVRE *et al.*, 2001; REY, 2008).

No Brasil, a comorbidade hepatite C/esquistossomose apresenta uma baixa prevalência entre a população geral, no entanto, altas taxas são observadas em pacientes provenientes de hospitais, variando entre 0,5%-19,66% (CONCEIÇÃO *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2001). Um estudo de Silva *et al.* (2011) encontrou que a prevalência de hepatite C foi de 7,4% nos pacientes com EHE. A grande quantidade de casos de comorbidade em pacientes com idade avançada reflete a exposição cumulativa aos fatores de risco para infecção pelo HCV, como transfusões sanguíneas, cirurgias, endoscopias, corroborando com vários autores no mundo inteiro (AQUINO *et al.*, 2000; BLANTON *et al.*, 2002; KAMAL *et al.*, 2000a; LACERDA *et al.*, 1993; PEREIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2008, 2011). No entanto, estudos epidemiológicos observaram que não há associação entre maior risco de se infectar pelo HCV quando o paciente é esquistossomótico hepatoesplênico (BERTHE *et al.*, 2007; KAMEL *et al.*, 1994; MUDAWI *et al.*, 2007a).

Em relação ao grupo comorbidade, a internação hospitalar, os procedimentos odontológicos e as práticas sexuais sem preservativo, além do compartilhamento de seringas para uso de medicamentos e drogas injetáveis foram os fatores que mais predispueram a infecção por HCV neste grupo. Este último fator apresentou diferença estatística quando relacionado ao grupo apenas com hepatite C.

A transfusão sanguínea, como fator de risco para o HCV, foi citada por 35,7% dos pacientes com a comorbidade e entre esses, todos haviam recebido transfusão antes de 1993, quando ainda não havia triagem sorológica para o HCV nos bancos de sangue no Brasil. Silva *et al.* (2011) afirmam que a transfusão sanguínea, recebida após episódios de sangramento do trato gastrointestinal alto, característicos de pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose, favoreceu a contaminação com o HCV, sendo considerada um importante fator de risco. Por conta disto, a idade dos pacientes com a comorbidade costuma ser mais elevada. Ainda, alguns estudos apontam que a realização de endoscopias digestivas, comuns em pacientes com varizes esofagianas, pode ser um importante fator de risco para a infecção pelo HCV (DELAROCQUE-ASTAGNEAU *et al.*, 2007; MIKHAIL *et al.*, 2007).

Avaliando o perfil de células T regulatórias nos grupos de pacientes deste estudo, foi observado um aumento significativo da quantidade relativa de células nTreg no grupo esquistossomótico, em relação ao grupos hepatite C e comorbidade (Tabela 3). Quando foi avaliada a quantidade relativa das iTreg, foi observada diferença estatística apenas nas comparações entre os grupos esquistossomose e comorbidade, sendo maior no primeiro grupo. As células T reg, tanto naturais como induzidas, agem bloqueando a ativação e o desenvolvimento de células T efetoras CD4⁺ e CD8⁺. Infecções crônicas causadas por helmintos estão associadas com o aumento do percentual de células T reg, especialmente as induzidas, reforçando os nossos resultados (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

Quando foi observado o percentual total de células T reg, houve diferença estatística entre os grupos com esquistossomose e com a comorbidade, havendo neste primeiro grupo um aumento do total destas células. Apesar de não ter havido diferença significativa entre os percentuais do total de T reg entre os grupos de

pacientes com hepatite C e comorbidade, essas células mostraram-se em maior quantidade no grupo hepatite C.

Corroborando com resultados deste trabalho, foi observado por alguns autores que, em PBMCs de sangue periférico, há uma alta produção da proteína FOXP3⁺ quando há infecção pelo *S. mansoni* (METENOU *et al.*, 2010; NAUSH *et al.*, 2011). Ainda, assim como este estudo, outros trabalhos afirmam que infecções por helmintos estimulam tanto a resposta imune de células T reg naturais quanto induzidas, ambas FOXP3⁺, com prejuízo das respostas Th1 e também Th2, embora esta última ainda seja predominante neste tipo de infecção (MCSORLEY *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2009; VAN DER WERF *et al.*, 2011).

Em relação à maior quantidade relativa de iTreg observada entre os pacientes esquistossomóticos, sabe-se que essas células podem ser ativadas devido aos antígenos do verme e do ovo de *S. mansoni* que são liberados localmente no tecido e no granuloma hepático e devido aos ovos que ficam retidos na mucosa intestinal, onde há um grande número de células TCD4⁺ *naive* (TURNER *et al.*, 2011; ZACONNE *et al.*, 2010). As células iTreg, quando ativadas, modulam positivamente a diferenciação de mais células T CD4⁺ *naive* em novas iTreg, geralmente em presença de TGF-β (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009). No entanto, Suffia *et al.* (2006) afirmam que as iTreg normalmente ficam restritas ao sítios de infecção e dependem de estimulação antigênica para serem ativadas e sua função supressora mantida, dessa forma, sem expressar um efeito significativo na circulação periférica.

Em pacientes com hepatite C crônica, há um aumento do número relativo de células T reg induzidas no fígado e também no sangue periférico quando comparado com indivíduos que conseguiram debelar a infecção durante a fase aguda (LOSIKOFF; SELF; GREGORY, 2012). Ebinuma *et al.* (2008) foram os primeiros a reportar o reconhecimento específico de epítomos do HCV em pacientes com hepatite C crônica por células T reg FOXP3⁺ provenientes do sangue periférico. Alguns estudos registraram o aumento de iTreg durante a infecção crônica pelo HCV, que produzem IL-10 e principalmente TGF-β, suprimindo a resposta imune efetora (MACDONALD *et al.*, 2002; LANGHANS *et al.*, 2010).

Segundo Gravano e Vignali (2008), no início da infecção pelo HCV, a resposta supressora inicial contra epítomos do vírus é modulada pelas nTreg e induz a ativação do fator FOXP3 em linfócitos T CD4⁺ *naive*, transformando-os em iTreg, que é responsável pela tolerância imunológica. As células nTreg normalmente estão associadas à supressão da auto-imunidade. Alguns autores afirmam que a estimulação destas células por epítomos do HCV é sugestiva de que há peptídeos homólogos a antígenos próprios neste vírus (LI *et al.*, 2007; MISHIRO *et al.*, 1991). No entanto, em relação aos nossos resultados, não foi observado um percentual significativo de células nTreg em sangue periférico frente à infecção pelo HCV ou quando estava associada à esquistossomose, provavelmente porque os pacientes já estivessem na fase crônica da hepatite C, quando a quantidade de células iTreg geralmente é maior do que a de nTreg (LOSIKOFF; SELF; GREGORY, 2012).

O aumento da quantidade relativa de células iTreg observado entre os pacientes com HCV pode ser explicado pelo fato de que as células T CD4⁺FOXP3⁺ respondem mais rapidamente à estimulação antigênica do que as células T CD4⁺ efetoras. Como a função supressora do primeiro tipo celular é logo ativada, ocorre o rápido aumento da frequência das células iTreg e a indução do fenótipo regulatório mais rapidamente do que o fenótipo efetor (MCSORLEY *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2009; VAN DER WERF *et al.*, 2011).

A indução de células T reg, tanto naturais quanto induzidas, por vírus pode ter duas consequências antagônicas: a persistência viral e a prevenção do dano tecidual exacerbado devido a respostas imunes efetoras (BELKAID, 2005; MILLS, 2004). Embora a ativação de células regulatórias propicie a evolução da doença para a cronicidade, elas têm o papel de limitar a resposta imune localizada e o dano tecidual hepático (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

A resposta vigorosa de células T efetoras CD4⁺ e CD8⁺ contra o HCV na fase aguda é responsável pela eliminação do vírus em 1/3 dos indivíduos infectados. Quando isto não acontece, células T efetoras podem ser deletadas também devido a outros processos imunológicos como superestimulação antigênica, anergia (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2008), atividade supressora de células T regs e também às mutações virais. Todos esses são fatores que contribuem para persistência viral e

para a cronicidade da infecção pelo HCV (BOETTLER *et al.*, 2005; RUSHBROOK *et al.*, 2005).

Cabe salientar que as células T reg de pacientes com hepatite C crônica são mais responsivas e apresentam maior atividade imunossupressora do que aquelas células encontradas em pacientes que tiveram a infecção aguda e ficaram curados, sugerindo que a evolução para cronicidade da infecção é importante para a expansão do número e ativação de células T reg (MANIGOLD *et al.*, 2006).

Quando foi relacionado o percentual de células T reg naturais, induzidas e totais com o grau de fibrose hepática no grupo de pacientes com hepatite C, que foi subdividido em dois: F0/F1 com ausência de fibrose e ou fibrose pouco significativa e F2/F3/F4 com fibrose significativa ou avançada, não foi observada qualquer associação entre o percentual dessas células com o maior ou menor grau de fibrose (Tabela 4). Em relação à atividade inflamatória, mesmo tendo observado o aumento do percentual de células nTreg, iTreg e T reg totais no grupo sem atividade inflamatória (A0/A1) em relação ao grupo que apresentou esta atividade (A2/A3), o que indicaria um efeito protetor, também não houve diferença estatística entre estes subgrupos de pacientes (Tabela 5). Um viés pode ser o número de pacientes em cada subgrupo ser relativamente pequeno.

Quando foi comparada a quantidade relativa de nTreg, iTreg e o percentual de T reg total nos subgrupos com fibrose hepática F2/F3/F4 ou com atividade inflamatória A2/A3, entre os grupos hepatite C e comorbidade, foram encontrados perfis de T reg semelhantes entre eles, sem diferença estatística (Tabelas 6 e 7, respectivamente). Ainda não é muito claro por que o sistema imune humano geralmente falha na eliminação viral, uma vez que é um sistema multifatorial (LI *et al.*, 2009).

Corroborando com os resultados das Tabelas 6 e 7, Ferri *et al.* (2011) afirmaram que não há qualquer relação entre a quantidade de células T reg circulantes ou intra-hepáticas e o grau de fibrose no fígado em pacientes com hepatite C. No entanto, houve um aumento de células T reg naturais e totais nos pacientes com graus de fibrose mais avançados na hepatite C crônica, dado semelhante ao encontrado no presente estudo, embora não tenha sido significativo em relação ao grupo CM.

Por outro lado, Fu *et al.* (2007) relataram que há correlação entre o aumento do percentual de células T reg e o desenvolvimento de câncer hepático, uma vez que essas células são responsáveis por inibir a resposta efetora anti-tumoral. Muitos parâmetros podem contribuir para estas discrepâncias de resultados, incluindo o perfil genotípico e fenotípico dos pacientes, o estágio da doença e o método utilizado para identificar as células T reg, além do número de pacientes que compõem os grupos.

Yoshizawa *et al.* (2010) também avaliaram a frequência de células T reg naturais em sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica, cirrose e CHC. A frequência dessas células foi aumentada nos três grupos em relação a indivíduos saudáveis. Não houve relação entre os padrões de fibrose nem a atividade inflamatória e a frequência de células T reg, concordando com os resultados encontrados neste estudo e também nos de Cabrera *et al.* (2004) e Cao *et al.* (2007).

No entanto, dados de Claassen *et al.* (2010) demonstraram que um grande número de células T reg CD4⁺FOXP3⁺ com atividade imunossupressora está localizado no infiltrado crônico hepático, mas não no sangue periférico e pode resultar na limitação da evolução da fibrose, sugerindo que elas agem através da imunomodulação da resposta imune e da supressão da ativação excessiva de linfócitos efetores contra hepatócitos infectados pelo vírus C. Ainda, a maioria das células T reg intra-hepáticas expressariam baixos níveis de CD25⁺, não sendo encontrado um número significativo de células nTreg neste tecido.

Estudar a frequência de células T reg em doenças inflamatórias no fígado utilizando amostras hepáticas é mais complicado do que avaliar estas células na corrente sanguínea periférica. Isso se dá porque os marcadores utilizados em células T reg sanguíneas circulantes são diferentes das células T reg teciduais e a obtenção do tecido hepático de pacientes, com quantidade de células suficientes para as metodologias utilizadas nem sempre é possível (PEISELER *et al.*, 2012).

Contradizendo Claassen *et al.* (2010), outros autores afirmaram que em infecções crônicas pelo HCV, há uma elevada capacidade imunossupressora das células T reg periféricas, observada em pacientes com baixos níveis de morte celular de hepatócitos, refletidos pelos baixos níveis de ALT (BOLACCHI *et al.*, 2006). No

entanto, este dado não aparenta ter qualquer relação com o controle ou resolução da imunopatologia da hepatite C, ou seja, com a evolução da fibrose hepática (BOLACCHI *et al.*, 2006).

Por outro lado, a associação de hepatite C com outras doenças pode acelerar a progressão da fibrose no tecido hepático. Sem a presença de outras enfermidades, a progressão da fibrose costuma ter evolução lenta e normalmente demora décadas, até evoluir para cirrose e CHC (CLAASSEN *et al.*, 2010).

Segundo alguns autores, a associação HCV/*S. mansoni* pode levar à aceleração do processo de fibrose e uma rápida progressão para o CHC, em relação àqueles pacientes que não tem a comorbidade (EL-ZAYADI *et al.*, 2005; HASSAN *et al.*, 2001). No presente trabalho, a progressão da fibrose hepática não pôde ser avaliada porque a seleção dos pacientes se deu em corte transversal.

Quando foram analisados os percentuais de células T reg e o padrão de fibrose nos pacientes com esquistossomose (Tabela 8), foi observada diferença estatística com aumento do percentual de células iTreg no padrão E/F em relação ao padrão D. Este fato ocorre provavelmente devido à maior duração do estímulo antigênico em padrões de fibrose mais avançados e conseqüentemente maior ativação das iTreg, corroborando com resultados de Wherry (2011). Este autor afirma ainda que uma elevada estimulação de células iTreg por antígenos do *S. mansoni* combinada com uma modulação da capacidade das APCs pode favorecer o estado de exaustão celular (hiporresponsividade) das células efetoras, levando-as à apoptose.

O fenômeno de exaustão celular é bem definido em células efetoras T CD8⁺ contra infecções virais e tumores e está associada com forte ativação do sistema imune induzida pela grande quantidade de antígeno ou persistência do mesmo por longos períodos. Esse fato pode levar a resposta efetora ao estado de falência imune, que é dependente do nível de exaustão celular. É possível que a perda da função efetora de citocinas Th2 observada em infecções por helmintos seja reflexo dos diferentes estágios dessa exaustão, muitas vezes sendo observado o aumento dos níveis de TGF- β e IL-10 concomitantemente (BORKOW *et al.*, 2000; LENG *et al.*, 2006).

Em infecções esquistossomóticas, o estado de hiporreatividade se sucede após uma forte resposta do tipo Th2, característica de infecções crônicas antigas e que leva à exaustão celular das células efectoras T CD4⁺ e T CD8⁺, com aumento relativo da quantidade de iTreg (WHERRY, 2011) e dos níveis de IL-10 e de TGF-β, sendo esta última estimuladora da produção iTreg teciduais (BORKOW *et al.*, 2000; LENG *et al.*, 2006). Esses estudos podem explicar porque foi encontrado um percentual maior de células iTreg no grupo esquistossomótico com padrão de fibrose mais avançado (padrão E/F) neste trabalho.

Quando foi analisado o grupo comorbidade em relação ao percentual de células T reg e os padrões de fibrose periportal (Tabela 9), foi encontrada diferença estatística com aumento do percentual de células iTreg, quando o padrão de fibrose foi mais avançado (E/F).

Além dos mecanismos supracitados que justificam os resultados semelhantes encontrados na Tabela 8, outros mecanismos imunológicos e bioquímicos ocorrem quando há a associação da infecção pelo HCV com *S. mansoni*. Apesar de o HCV estimular a resposta efectora Th1, no paciente esquistossomótico imediatamente há a predominância da resposta imune Th2. Isto pode resultar num aumento da replicação viral e uma progressão mais rápida para fibrose (EL-ZAYADI *et al.*, 2005; NAPOLI *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 1997). A persistência viral inicial em pacientes com a comorbidade pode causar a exaustão da resposta imune, com linfócitos T efetores anérgicos e/ou hiporresponsivos, o que pode agravar o quadro da hepatite C (WODARZ; KLENEMAN; NOWAK, 1998).

Embora as células Th2 efectoras permaneçam na circulação sanguínea durante a comorbidade, há um mecanismo de controle destas células, mantendo-as não funcionais, através de diferentes fatores extrínsecos regulatórios e moléculas mediadoras (KADY *et al.*, 2005). A exposição persistente aos antígenos de diversos tipos leva à indução da imunossupressão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TAYLOR; WERF; MAIZELS, 2012).

Similarmente, células Th2 com fenótipo anérgico têm sido descritas em infecções crônicas por helmintos isoladamente (CHAPPERT; SCHWARTS, 2010; MAIZELS *et al.*, 2003; SEMNANI *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2011), pois o *S. mansoni* possui a propriedade de mimetizar antígenos do hospedeiro e dessa forma, se

evade do sistema imune, já que mecanismos de auto-tolerância eliminam ou colocam em estado de anergia os linfócitos T autorreativos (SORCI; CORNET; FAIVRE, 2013). No entanto, algumas etapas desse mecanismo continuam sem elucidação.

Na esquistossomose, a hiporresponsividade de células T CD4⁺ Th2 indica exaustão celular diferente da observada em células T CD8⁺, ou então uma forma de tolerância adaptativa desenvolvida em situações de persistência de estimulação antigênica (SCHWARTZS, 2003). No entanto, as células anérgicas e as hiporresponsivas aparentam ter funções similares. Porém uma análise gênica mais detalhada dessas células se faz necessária para caracterizar as suas diferenças (WHERRY, 2011).

Ainda, em situações extremas, quando há uma grande quantidade de estímulo antigênico, como ocorre na comorbidade hepatite C/esquistossomose, as células Th2 efetoras podem ser convertidas em iTreg, com expressão de FOXP3⁺, num fenômeno chamado de plasticidade celular (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2008; COLLISON *et al.*, 2010). Este fenômeno resulta no desenvolvimento de tolerância imunológica adaptativa contra o patógeno e, conseqüentemente, um aumento do número de iTreg circulantes, mesmo na fase mais avançada da comorbidade, o que explicaria o aumento do percentual dessas células encontrado neste trabalho para os padrões E/F de fibrose. No entanto, há a flexibilidade do sistema imune em reverter a resposta de tolerância imunológica em resposta efetora novamente, quando há cura clínica das doenças, ratificando que a plasticidade do sistema imune pode ocorrer também a partir do sistema supressor para o efector (COLLISON *et al.*, 2010).

Ao se analisar o percentual de células T reg encontrado no padrão D de fibrose hepática entre os grupos esquistossomose e comorbidade (Tabela 10), foi observado maior percentual das células iTreg nos pacientes com esquistossomose e este percentual influenciou nas células T reg totais. Este resultado indica que, em doenças inflamatórias hepáticas crônicas por helmintos isoladamente, uma maior quantidade de iTreg pode estar associada a um perfil de menor morbidade e conseqüentemente a uma maior proteção do tecido hepático quando comparado

com o resultado observado na presença de comorbidade com hepatite C (KADY *et al.*, 2005).

Os resultados deste estudo corroboram com Kamal *et al.* (2001) que encontraram que pacientes apenas com esquistossomose apresentam baixa inflamação no tecido hepático, quando comparados ao pacientes com hepatite C ou com a comorbidade. No entanto, em pacientes com esquistossomose ou com a comorbidade, altos níveis de IL-10 foram encontrados, com predominância da resposta Th2. Em outro estudo de Kamal *et al.* (2004) foi observado que a progressão mais rápida da fibrose hepática no grupo comorbidade ocorreu devido à infecção pelo HCV e não à infecção por *S. mansoni*, quando os três grupos de pacientes foram comparados entre si. Ainda, foi observada uma maior produção de citocinas regulatórias IL-10 e principalmente TGF- β , durante a comorbidade. (KADY *et al.*, 2005).

Ao analisar os resultados obtidos na Tabela 11, houve diferença estatística nos percentuais de células nTreg e no de T reg totais encontrados nos padrões E/F entre os grupos esquistossomose e comorbidade. Estes resultados concordam com os achados de HESSE *et al.* (2004) que verificaram que a infecção crônica por *S. mansoni* em camundongos ilustra o efeito protetor das nTreg contra a imunopatologia da doença e a consequência de sua remoção da corrente sanguínea é o aumento do dano ao tecido hepático.

Uma explicação para este fato, segundo Yoshizawa *et al.* (2010), é que quanto mais grave o estágio da doença hepática esquistossomótica, ou seja, com padrões de fibrose mais avançados, maior o número de células nTreg periféricas. No entanto, estas células provavelmente são células T reg naturais de memória, uma vez que possuem o fenótipo CD45RA⁻, característico dessa população celular. O fenótipo CD45RA⁺ é característico de célula T CD4⁺ naturais *naive*. Ainda, esse fenótipo de nTreg de memória pode ter sido induzido, como já foi citado acima, durante a infecção inicial pelo *S. mansoni*, quando há polarização da resposta imune para o perfil Th2, com maior produção de citocinas imunomoduladoras, que favorecem a ativação de um número maior de células nTreg (BAUMGART *et al.*, 2006; HESSE *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005).

Apesar dos padrões de fibrose avançados nos grupos esquistossomose e comorbidade na Tabela 11, o maior percentual de nTreg foi observado na situação que apresenta menor morbidade, ou seja, no grupo com esquistossomose apenas, ratificando mais uma vez que um maior número dessas células no sangue pode indicar uma resposta imune efetora menos agressiva e uma maior proteção contra danos causados ao tecido hepático pelos patógenos.

O significado funcional das células T reg na susceptibilidade às infecções em humanos é um campo ainda difícil de elucidação, assim como as correlações entre os marcadores regulatórios e os mecanismos de supressão de células T efectoras (TAYLOR; WERF; MAIZELS, 2012).

A imunorregulação é um aspecto benéfico e essencial do hospedeiro na diminuição de respostas inflamatórias potenciais contra antígenos próprios e não próprios e as células T reg claramente controlam a resposta imune Th2 em infecções helmínticas, quando não estão associadas com outras doenças (TAYLOR; WERF; MAIZELS, 2012).

Se por um lado, a resposta imunorreguladora de células T reg protege o tecido hepático contra danos causados por uma resposta imune efetora, por outro, a presença dessas células durante infecções é uma importante barreira para vacinação e estratégias de tratamento, porque suprimem justamente esta resposta, que é essencial no combate às infecções (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

Os mecanismos pelos quais as células T reg limitam as respostas imunes *in vivo* ainda estão pouco compreendidos. Um dos principais mecanismos propostos é que as células T reg naturais indiretamente modulam a função das APCs e, além disso, produzem citocinas supressoras como TGF- β e IL-10. A produção dessas citocinas tem se mostrado importante para que as células T reg exerçam sua função supressora *in vivo* (TANG *et al.*, 2006; VON BOEHMER, 2005).

Para a citocina IL-10, houve diferença estatística entre os pacientes com hepatite C e com esquistossomose, com níveis mais elevados neste último grupo. Não houve diferença significativa entre as médias desta citocina entre os grupos de pacientes com esquistossomose e com a comorbidade.

Esse resultado corrobora com o estudo de Kady *et al.* (2005) que afirmam que a esquistossomose é caracterizada por uma forte resposta imune do tipo Th2, com produção aumentada de IL-10. No entanto, quando há infecção viral por HCV, há produção de IFN- γ , podendo levar a indução da resposta Th1, com redução da produção de IL-10. Mesmo assim, na comorbidade, os níveis dessa última citocina se mantêm aumentados quando comparados com pacientes com apenas HCV, que é um resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Ainda, outros autores compartilham da mesma conclusão quando afirmam que na comorbidade, há alteração no padrão de citocinas, na resposta efetora citotóxica de linfócitos e prejuízo de outras respostas imunes com a diminuição da capacidade de eliminação do HCV (KAMAL *et al.*, 2001b; SUK; KIM; KIM, 2001). De acordo com os resultados destes autores, também foi encontrado aumento significativo dos níveis de IL-10 em pacientes com a comorbidade e com esquistossomose em relação àqueles com hepatite C apenas.

A função da IL-10 tem sido estudada em modelos murinos de *S. mansoni* e tem sido demonstrado que esta citocina é responsável pelo controle de respostas Th1 e Th2, supressão de ativação de macrófagos e células dendríticas e ainda limita a hepatotoxicidade durante a fase aguda da infecção, evitando dano tecidual hepático intenso (HESSE *et al.*, 2004; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; OSWALD *et al.*, 1992).

No entanto, Hesse *et al.* (2004) afirmam que, no contexto da esquistossomose, os efeitos regulatórios da expressão de FOXP3⁺ parecem continuar mesmo na ausência de IL-10. Este grupo acredita que a IL-10 tenha atuação mais local e regula principalmente a formação do granuloma, em vez de suprimir a resposta Th2 sistêmica, contrariando dados de De'Broski *et al.* (2008) e Couper *et al.* (2008). Além disso, alguns autores afirmam que as T reg FOXP3⁺ agem independente da citocina IL-10 (BAUMGART *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2005; TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006; WILSON *et al.*, 2005), com resultados divergentes de outros trabalhos publicados (DE'BROSKI *et al.*, 2008; HESSE *et al.*, 2004; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; OSWALD *et al.*, 1992).

Quando foram analisados os resultados da dosagem de TGF- β no soro dos três grupos de pacientes, foi observada diferença entre os grupos hepatite C e

esquistossomose e entre os grupos esquistossomose e comorbidade, sendo encontrada no grupo esquistossomose menor quantidade desta citocina. Isto indica que a infecção pelo HCV parece estimular a produção de TGF- β . Porém, em relação a esta citocina, há controvérsias na literatura sobre sua indução e função regulatória.

Andersson *et al.* (2008) mostraram que a principal função do TGF- β é converter células T *naive* FOXP3⁻ em FOXP3⁺ (iTreg), via TCR, com ligação direta em células dendríticas, inibindo a função de APC destas últimas, corroborando com outros estudos (AKBAR *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2003; DAVIDSON *et al.*, 2007; FANTINI *et al.*, 2004; SHEEVACK, 2005). Esta citocina também parece ser importante na manutenção da tolerância imune e no número de nTreg circulantes (LI; SANJABI; FLAVELL, 2006; MARIE *et al.*, 2005). No entanto, Turner *et al.* (2009) afirmaram que a indução da expressão de FOXP3 pode ser realizada *in vitro* utilizando-se baixas doses de estímulo antigênico, independentemente da presença de TGF- β .

Em resumo, estes autores demonstraram que a indução da expressão de FOXP3⁺ em células T CD4⁺ *naive* por TGF- β é modulada pela combinação de fortes sinais coestimulatórios/TCR e que a duração prolongada desta sinalização pode ter o efeito inverso, resultando na perda da expressão de FOXP3 em células T reg induzidas *ex vivo* (GABRYSOVÁ *et al.*, 2011).

Ainda, as nTreg controlam a ação de células efetoras através de contato direto e através da secreção de citocinas inibitórias como TGF- β e IL-10, sendo o TGF- β responsável por inibir a secreção de IFN- γ pelas células T efetoras (BOETTLER *et al.*, 2005; CABRERA *et al.*, 2004; GRABOWSKA *et al.*, 2001), numa autorregulação positiva, justificando seus níveis aumentados em presença do HCV nos grupos hepatite C e comorbidade neste estudo. Cabrera *et al.* (2004) afirmaram que as nTreg secretam grandes quantidades de TGF- β e estão envolvidas na persistência viral, através da inibição pelo contato célula-célula, devido ao marcador CD25⁺, que é receptor de IL-2 e que inibe a atividade desta citocina por competição do sítio de ligação com os linfócitos T efetores.

Outra explicação para o aumento dos níveis de TGF- β nos grupos infectados pelo HCV é que esta citocina é encontrada em níveis elevados no soro quando há cirrose e/ou tumores pequenos e iniciais no fígado (SONG *et al.*, 2002), ou seja nos

grupos em que a doença hepática apresenta maior morbidade. Os achados destes autores sugerem que o aumento da frequência de células T reg na cirrose hepática e nos estágios iniciais do CHC podem ser as responsáveis pelo aumento da produção de TGF- β . No entanto, mais estudos são necessários para explicar a relação entre estas citocinas e o número de células T reg naturais de memória em pacientes com CHC.

O TGF- β é produzido em altos níveis durante infecções crônicas e também é considerado um fator importante para a estimulação de células iTreg em mucosas ou linfonodos (CHEN *et al.*, 2003; GREEN *et al.*, 2003; LI; FLAVELL, 2008; ZHENG *et al.*, 2004).

Em relação à infecção esquistossomótica, De'Broski *et al.*, (2008) sugerem que o TGF- β tem efeito local pequeno na supressão de células efectoras, enquanto que a IL-10 tem efeito sistêmico na inibição dessas células e no padrão de citocinas produzido. Porém, tanto a IL-10 quanto o TGF- β agem sinergicamente para promover a sobrevivência do hospedeiro, limitando a inflamação e atenuando os danos hepáticos causados durante a fase aguda da esquistossomose (DE'BROSKI *et al.*, 2008). Esses autores ainda concluem que embora macrófagos e células dendríticas produzam TGF- β durante a infecção parasitária e esta citocina possa suprimir a imunidade Ag-específica das APCs, além de promover a diferenciação das células T CD4⁺ *naive* e estimular a função supressora das nTreg, ainda não foi demonstrado que o TGF- β seja capaz de suprimir a inflamação induzida por *S. mansoni* de uma forma eficiente.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados no trabalho de De'Broski *et al.* (2008), visto que a IL-10 foi observada em níveis mais aumentados no grupo com menor morbidade, que é o grupo esquistossomótico, enquanto que a produção de TGF- β não pareceu ser significativa durante a infecção por *S. mansoni* isoladamente. Estudos *in vivo* apontam que a produção de IL-10 pelas células T reg é um fator indispensável para a ativação de sua atividade supressora (BELKAID, 2007; MCGEACHY; STEPHENS; ANDERTON, 2005).

Quando foram avaliados os resultados encontrados para os graus de fibrose F2/F3/F4 e os níveis de citocinas entre os grupos de pacientes com hepatite C e comorbidade, foi encontrada diferença estatística apenas entre as médias para a

citocina IL-10 (Tabela 13). Seus níveis foram mais elevados no grupo comorbidade, no qual há polarização para resposta Th2 induzida pelo *S. mansoni*, fato anteriormente discutido. Já os níveis de TGF- β encontrados entre os grupos hepatite C e comorbidade foram muito semelhantes.

Por outro lado, quando foram avaliados os padrões de fibrose E/F entre os grupos com esquistossomose e com a comorbidade, para as duas citocinas acima, nenhuma diferença estatística foi encontrada (Tabela 14), sugerindo que a alta produção de IL-10 ocorra desde os padrões de fibrose iniciais da esquistossomose e seja mantida ao longo da infecção. Não foi encontrada diferença entre os níveis de TGF- β entre esses dois grupos de pacientes para este padrão de fibrose.

A expansão e ativação das células T reg diminuem a resposta Th2 contra os ovos de *S. mansoni* e conseqüentemente controlam o dano tecidual hepático causado pelas células efetoras (BAUMGART *et al.*, 2006; TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006), havendo correlação inversa entre a evolução da agressão ao fígado e o número de células iTreg (WANTANABE *et al.*, 2009).

No granuloma, o antígeno SEA pode induzir a produção de TGF- β (ZACCONE *et al.*, 2010) por células T dos linfonodos e a ativação de células T CD4⁺ *naïve* em iTreg, com função supressora, tudo isso num ambiente polarizado para resposta Th2, com altos níveis de IL-10.

Este resultado sugere que, durante a comorbidade, mesmo com o perfil de citocinas polarizado para Th2 devido à infecção pelo *S. mansoni* e com altos níveis de IL-10, esta citocina, por si só, não é capaz de desempenhar papel protetor ao dano hepático isoladamente. Para que a proteção ao tecido hepático ocorra, o percentual aumentado de células T reg circulantes e sua ativação são importantes na imunomodulação da resposta efetora, tendo seu efeito supressor estimulado quando a resposta imune dominante é do tipo Th2, como ocorre na esquistossomose isoladamente.

Ainda não foi esclarecido como as células iTreg conseguem limitar o dano tecidual hepático e a fibrogênese quando o paciente tem hepatite C (CLAASSEN *et al.*, 2010). Uma possibilidade é que a IL-10 iniba a deposição de matriz de colágeno pelas células hepáticas estreladas (WANG *et al.*, 1998), por isso encontramos níveis baixos desta citocina quando a infecção pelo vírus C ocorre isoladamente. Ainda, as

células T reg, quando localizadas no tecido hepático, promovem a inibição de outras células hepáticas que indiretamente inibem a atividade das células estreladas. Ao contrário da IL-10, o TGF- β produzido por células T reg estimula as células estreladas a produzirem matriz de colágeno, dessa forma, favorecendo a fibrose em indivíduos com hepatite C e com a comorbidade (SHI; WAKIL; ROCKEY, 1997).

Por outro lado, Piccirillo *et al.* (2002) mostraram que a produção ou estimulação de TGF- β por si só não é capaz de ativar a resposta supressora de T reg CD4⁺CD25⁺, parecendo não ter influência quando avaliado sozinho na ativação destas células. No entanto, eles não avaliaram a indução de expressão de FOXP3⁺ em presença de TGF- β .

A contribuição do TGF- β *in vivo* na capacidade imunossupressora das T reg ainda está difícil de ser provada. Mamura *et al.* (2002) demonstraram que a produção autócrina desta citocina pelas T reg não é essencial para sua atividade supressora. No entanto, o estudo de Maynard *et al.* (2007) em camundongos deficientes de TGF- β comprovou que linfócitos TCD4⁺ *naive* não são convertidos em iTregs, nem produzem IL-10.

Em relação às células nTreg, alguns autores afirmaram que o TGF- β não é essencial para a geração destas células (LI; SANJABI; FLAVELL, 2006; MARIE; LIGGITT; RUDENSKY, 2006), uma vez que camundongos deficientes desta citocina apresentavam um quantitativo normal de nTreg no timo. Porém, quando há deficiência de TGF- β e IL-2 simultaneamente, não foi observada a presença de células nTreg neste órgão por Liu *et al.* (2008). Por outro lado, acredita-se que a IL-2 por si só não é necessária para ativar o fator de transcrição FOXP3⁺ no timo, visto que camundongos deficientes desta citocina apresentaram populações de nTreg neste órgão (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2004). A produção de citocinas imunossupressoras pelas células T reg e a função destas citocinas na ativação das próprias T reg ainda permanecem como um campo desconhecido e a ser explorado na imunologia.

A indução e ativação de células T reg, através da manipulação da resposta imune, representam um objetivo terapêutico quando o dano tecidual hepático for excessivo. Em modelos murinos, a transferência de células T reg naturais foi suficiente para controlar e estabilizar a doença inflamatória hepática causada pelo S.

mansoni, em presença de IL-2 e TGF- β (MOTTET; UHLIG; POWRIE, 2003; SINGH *et al.*, 2005).

Após a avaliação das células T reg através da quantificação relativa por citometria de fluxo e da dosagem de citocinas imunossupressoras e a comparação com os graus/padrões de fibrose hepática, também foi verificada a expressão do gene FOXP3 em PBMCs periféricos. A quantificação relativa deste gene foi realizada através de PCR em tempo real, utilizando o método do Δ Ct comparativo e o gene da β -actina como controle endógeno.

O resultado obtido das comparações das médias dos Δ Cts dos grupos estudados foi estatisticamente significativo entre os pacientes com hepatite C ou esquistossomose quando comparados com o grupo comorbidade (Tabela 15). Ao se utilizar o $\Delta\Delta$ Ct na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para realizar a quantificação relativa da expressão gênica do FOXP3, foi observado que este gene é expresso 4,27 vezes e 4,89 vezes mais nos grupos de pacientes com hepatite C e com esquistossomose, respectivamente, do que no grupo com a comorbidade.

A expressão gênica de FOXP3 mais elevada nos grupos esquistossomose e hepatite C em relação ao grupo com a comorbidade indica que essas células provavelmente estão mais ativadas e funcionais durante a infecção pelo patógeno isolado. No entanto, os resultados encontrados na citometria de fluxo mostram que as células T reg estão em maior quantidade no grupo esquistossomótico, que apresenta menor morbidade. Não houve diferença estatística entre a expressão gênica de FOXP3 entre os grupos esquistossomose e hepatite C, embora a hepatite C isolada seja mais agressiva ao tecido hepático do que a infecção esquistossomótica pura (KADY *et al.*, 2005).

Nas células T reg, a expressão do fator de transcrição FOXP3 está condicionada à demetilação de regiões gênicas específicas no cromossomo X, como o exon 1 do TSDR (*T reg cell specific demethylation region*). Nas células iTreg, há uma demetilação parcial neste sítio, ao contrário do que acontece nas células nTreg, nas quais a demetilação é total. Por esse motivo, alguns autores acreditam que a expressão de FOXP3 esteja mais elevada e seja mais estável em células nTreg e com isso, acredita-se que sua atividade imunossupressora também seja mais

intensa. No entanto, há diferenças marcantes entre a demetilação do FOXP3 *in vitro* e *in vivo* (HUEHN; POLANSKY; HAMANN, 2009; MELO; CARVALHO, 2009).

Quando há mutação do gene FOXP3 e conseqüentemente falha na sua expressão *in vivo*, a progressão da doença costuma ser rápida, indicando que as células T reg atuam na proteção contra danos teciduais e contra a superestimulação imune (HSIEH *et al.*, 2006).

Em modelo murino, a transferência do gene FOXP3, inserido em retrovírus, para o sítio de formação de granuloma, aumentou a expressão deste gene no local e fortemente suprimiu o desenvolvimento exacerbado do granuloma (SINGH *et al.*, 2005). Quando há o tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD25 *in vitro* para remoção das T reg CD25⁺, há um aumento significativo do tamanho do granuloma nos tecidos, sugerindo que a contenção do mesmo se faça também por células nTreg (TURNER *et al.*, 2011).

Ainda, a depleção de células T reg, através da manipulação da resposta imune em camundongos, durante a infecção viral aguda pelo HCV, pode prevenir contra a persistência viral e aumentar a eficiência de vacinas. No entanto, também pode causar um dano tecidual hepático grave, caso as células T CD8⁺ efetoras não sejam suprimidas no tempo certo (SUVAS *et al.*, 2003).

Por outro lado, para que a vacinação contra helmintos seja efetiva, o epítipo antigênico utilizado não pode estimular o desenvolvimento de T regs ou então tem que ser incorporado com algum adjuvante na tentativa de neutralizar a resposta supressora das T reg antes de estimular a resposta efetora. Com isto, seria possível resgatar a função efetora de células Th2 e estimular novos *pools* para diferenciação neste tipo celular, num ambiente livre de células T reg, para restaurar a imunidade anti-helmíntica (TAYLOR; WERF; MAIZELS, 2012).

Em relação à infecção pelo HCV, foi encontrada evidência que o efeito supressor das nTreg tem um distinto *set* de genes ativados e que é importante para suprimir as células T efetoras, o que ajuda a explicar por que as nTreg podem influenciar na resolução da infecção por esse vírus durante a infecção aguda (LI *et al.*, 2009). Novas explicações têm sido propostas por estes autores, na tentativa de compreender como ocorre a evasão do HCV pelo sistema imune, a tolerância imunológica e a ativação de células T reg naturais durante esta infecção. No

entanto, dois fatores que prejudicam a obtenção de um peptídeo imunogênico para vacina que contemple todos os genótipos de HCV é a variabilidade genética do vírus e seus subtipos, além da grande variabilidade do HLA dos pacientes infectados, fazendo com que cada resposta imune durante a infecção pelo HCV seja bastante específica (LI *et al.*, 2009).

Já foi dito que um número grande de células T reg naturais ou induzidas prejudicam a resposta contra vacinas, pois elas suprimem a função efetora de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. No entanto, um número muito reduzido destas células T reg ou uma completa ausência das mesmas podem induzir a graves doenças auto-imunes e levar o indivíduo à morte (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2008).

Há um balanço entre os pontos positivos e negativos da resposta imune supressora das células T reg, um verdadeiro equilíbrio entre patógeno e hospedeiro. Porém, em alguns casos, quando a supressão é excessiva, o patógeno pode se multiplicar/replicar descontroladamente, invadindo o tecido do hospedeiro, danificando a estrutura do órgão e levando o paciente à morte (BELKAID, 2007).

Devido a esses fatores, acredita-se que as células T reg são indispensáveis na manutenção da homeostase da imunidade, na tolerância imunológica e na defesa de tecidos importantes contra respostas imunes efectoras exacerbadas frente a patógenos. Qualquer manipulação do número ou da função dessas células ou da administração de citocinas imunossupressoras deve ser realizada com total conhecimento de como ocorre a ativação e o mecanismos de ação das células T reg e também, das consequências de seu efeito, por ser considerada uma manipulação de risco (TAAMS, 2006; ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009).

Mais estudos são necessários para que as células T reg, especialmente as iTreg, possam ser utilizadas no futuro em imunoterapia para auxiliar no controle de doenças hepáticas crônicas, especialmente as mais agressivas, como a hepatite C, isolada ou associada a outras enfermidades.

Dessa forma, pode-se afirmar que esta pesquisa é pioneira no estudo de células T regulatórias em doenças infecciosas hepáticas crônicas, pois avaliou estas células sob três aspectos fundamentais: a expressão gênica do FOXP3, a quantificação relativa do número dessas células circulantes no sangue e a produção de citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β .

Além disso, este trabalho avaliou grupos de pacientes de extrema importância para o cenário da saúde pública brasileira: hepatite C, esquistossomose e comorbidade. Este último grupo ainda é muito pouco estudado, principalmente no que tange às questões sobre a imunopatologia da associação hepatite C/esquistossomose.

O conhecimento gerado com esta pesquisa pode auxiliar no entendimento da imunopatologia dessas doenças e as abordagens imunológicas deste estudo podem nortear o desenvolvimento de imunoterapias e de vacinas para as doenças em questão.

9 CONCLUSÕES

- a) Nos pacientes com a CM, a média de idade foi mais avançada do que nos pacientes com hepatite C e esquistossomose isoladamente, sugerindo que o maior tempo de duração da doença esquistossomótica pode predispor ao risco de se infectar pelo HCV. No grupo CM, a utilização de seringas de vidro não descartáveis foi um fator de risco importante para a infecção pelo HCV, indicando que este grupo fez uso de medicamentos/drogas injetáveis mais frequentemente do que o grupo de pacientes com hepatite C isolada.
- b) O perfil imunológico Th2 da esquistossomose e a presença de IL-10 podem induzir a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em iTreg, com a observação do aumento do seu percentual neste grupo. Ainda, quando há a presença da comorbidade HCV/*S. mansoni*, a ativação de iTreg diminui, concluindo-se que o HCV provavelmente inibe a diferenciação e ativação das T reg por mecanismos de anergia, exaustão celular e/ou hiporresponsividade, ainda não completamente elucidados.
- c) Os pacientes esquistossomóticos e os do grupo CM com padrões de fibrose mais avançados apresentaram aumento das iTreg, provavelmente devido à maior duração do estímulo antigênico decorrente dos ovos de *S. mansoni*, retidos nos tecidos hepático e intestinal.
- d) Altos níveis da citocina IL-10 produzidos pelos pacientes infectados apenas pelo *S. mansoni* só possuem efeito supressor e protetor ao tecido hepático quando associados ao maior percentual de células T reg circulantes. Isto é confirmado ao se observar que esta citocina também teve sua produção aumentada em pacientes com a CM, no entanto este grupo apresentou um percentual de células T reg consideravelmente menor do que na esquistossomose isolada.
- e) Os níveis de TGF- β foi maior nos grupos com hepatite C e CM, sugerindo que a infecção pelo HCV pode estimular a produção desta citocina e conseqüentemente uma maior deposição de matriz de colágeno no tecido hepático, favorecendo a progressão da fibrose hepática.

- f) Foi observada uma maior expressão relativa do gene FOXP3 no grupo esquistossomótico do que no grupo CM, indicando que as células T reg estão mais ativadas neste primeiro grupo. No entanto, apesar de o gene FOXP3 estar expresso 4,2 vezes mais nos pacientes com hepatite C do que no grupo comorbidade, as células T reg parecem não exercer totalmente sua função supressora nos pacientes infectados apenas pelo HCV.
- g) Dessa forma, concluímos que as doenças hepáticas crônicas de menor morbidade, com a resposta efetora polarizada para Th2, como ocorre na esquistossomose, apresentam maior percentual de células T reg periféricas circulantes e ativadas, maior produção de IL-10 e expressão de FOXP3. Ainda, as células T reg podem ter efeito supressor na ativação exacerbada de respostas imunes inflamatórias, exercendo papel protetor ao tecido hepático e limitando o dano tecidual, atuando no balanço das respostas efetoras e supressoras. Portanto a manipulação do seu número ou função ou ainda, a administração da citocina IL-10 podem ser objetos de estudos futuros para proposição de imunoterapias e vacinas contra infecções pelo HCV ou *S. mansoni*, no intuito de reduzir ou controlar o dano tecidual hepático causado por esses patógenos.

10 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, serão publicados quatro artigos científicos sobre o tema: o primeiro abordará o percentual de células T regulatórias e a comparação com os graus/padrões de fibrose hepática nos grupos; o segundo discutirá o perfil das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β e a expressão gênica de FOXP3 nestes grupos; o terceiro artigo irá abranger uma análise detalhada sobre o perfil completo das células T reg e as comparações intergrupos, associando aos graus/padrões de fibrose em pacientes com esquistossomose, com hepatite C e com a comorbidade e por fim, será escrito um artigo de revisão sobre as células T regulatórias.

Posteriormente em outro projeto, será avaliado o perfil de citocinas anti-inflamatórias, pró-inflamatórias e Th17, utilizando o soro dos pacientes dos três grupos já cadastrados. Esta avaliação servirá para compreender melhor o mecanismo de atuação dessas moléculas frente à esquistossomose, à hepatite C e à comorbidade, auxiliando em futuras propostas de imunoterapia, como já ocorre em várias outras doenças crônicas.

Além disso, será realizada uma busca ativa dos pacientes já cadastrados na pesquisa para uma nova coleta de sangue, e assim ser possível estudar, através de citometria de fluxo, outros marcadores celulares importantes, inclusive o perfil de células Th17 nos pacientes que apresentam hepatite C e a CM.

Também, com o material genético (cDNA) já obtido neste projeto, será realizado um estudo mais aprofundado de biologia molecular nesses três grupos de pacientes para o gene FOXP3 e outros genes de interesse.

Vale salientar que qualquer novo projeto que venha a ser executado a partir deste, será submetido ao comitê de ética em pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e somente será iniciado após sua aprovação.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 22, p. 85-91, 2006.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and molecular immunology*, 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2005.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AKBAR, A. N. *et al.* The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nature Reviews - Immunology*, London, v. 7, p. 231-237, 2007.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 13, n. 17, p. 2436-2441, 2007.
- ALVARIZ, F. G. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. *Moderna Hepatologia*, Rio de Janeiro, v. 30, p. 20-32, 2004.
- ANDERSSON, J. *et al.* CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *Journal of Experimental Medicine*, New York, n. 205, p. 1975-1981, 2008.
- ANDRADE, L. M. *Alterações na morfologia hepática observadas à ressonância magnéticas em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica*. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- ANGELICO, M. *et al.* Chronic liver disease in the Alexandria governorate, Egypt: contribution of schistosomiasis and hepatitis virus infections. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 26, p. 236-243, 1997.
- AQUINO, R. T. *et al.* Hepatitis B and C virus markers among patients with hepatosplenic mansonic schistosomiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 313-320, 2000.
- ARAÚJO, K. C. G. M. *et al.* Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 409-417, 2007.
- ARAUJO, M. I. *et al.* Evidence of T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 26, p. 1399-1403, 1996.

ARAÚJO, M. I. *et al.* The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1619-1625, 1994.

ARICHA, R. *et al.* Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis. *Journal of Immunology*, Baltimore, n. 180, p. 2132-2139, 2008.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T-cells and FOXP3 in human diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 227-235, 2007.

BAIN, C. *et al.* Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, Baltimore, v. 120, n. 2, p. 512-524, 2001.

BARBOSA, C. S. *et al.* Spatial distribution of Schistosomiasis foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, p. 79-83, 2004.

BARNABA, V. Hepatitis C virus infection: a liaison a trois amongst the virus, the host and chronic low-level inflammation for human survival. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 53, p. 752-761, 2010.

BAUMGART, M. *et al.* Naturally occurring CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *Journal of Immunology*, Baltimore, p. 5374-5387, 2006.

BELKAID, Y. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*, New York, v. 6, p. 353-360, 2005.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews*, London, v. 7, p. 875-888, 2007.

BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia, v. 18, p. 406-412, 2006.

BENGSCHE, B. *et al.* Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *Plos Pathogens*, San Francisco, v. 6, p. e 1000947, 2010.

BERTHE, N.; MYRVANG, B.; GUNDERSEN, S.G. Intensity of *Schistosoma mansoni*, hepatitis B, age and sex predict levels of hepatic periportal thickening/fibrosis (PPT/F): A large-scale community-based study in Ethiopia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 1079-1086, 2007.

BILLERBECK, E.; BOETTLER, T.; THIMME, R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 13, n. 36, p. 4858-4864, 2007.

BLANTON, R. E. *et al.* Population-based differences in Schistosomiasis mansoni and hepatitis C induced disease. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 185, p. 1644-1649, 2002.

BOETTLER, T. *et al.* T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 79, p. 7860-7867, 2005.

BOLACCHI, F. *et al.* Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4⁺ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clinical and Experimental Immunology*, London, v. 144, p. 188-196, 2006.

BORKOW, G. *et al.* Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 106, p. 1053-1060, 2000.

BOTROS, S. *et al.* Activity of 9-(S)-[3-hydroxy-2 (phosphonomethoxy)propyl]adenine against *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 47, n. 12, p. 3853–3858, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais*, n. 1, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância em Saúde*. 2. ed., Brasília, 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia de vigilância Epidemiológica*. 6. ed., Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Hepatites Virais: O Brasil está atento*. 3. ed., Brasília, 2008b.

CABRERA, R. *et al.* An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, Baltimore, v. 40, p. 1062-1071, 2004.

CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Reviews – Immunology*, London, v. 7, n. 4, p. 305-310, 2007.

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.

CAO, M. *et al.* Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *Laboratory Investigation*, Baltimore, v. 87, p. 582-590, 2007.

CARRAZZONE, C. F. V. *et al.* Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 93-98, 2004.

CASTELLO, G. *et al.* HCV-related hepatocellular carcinoma : from chronic inflammation to cancer. *Clinical Immunology*, Orlando, v. 134, p. 237-250, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Recommendations for preventions and control of hepatitis C virus (HCV) and HCV-related chronic disease*. Atlanta, 1998.

CHAPPERT, P.; SCHWARTZ, R. H. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia, v. 22, p. 552-559, 2010.

CHEEVER, A. W.; YAP, G. S. Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. *Chemical Immunology*, Basel, v. 66, p. 159–176, 1997.

CHEN, W. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

CHITSULO, L. *et al.* The global status of Schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, Basel, v. 77, p. 41-51, 2000.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. *Analytical Biochemistry*, New York, n. 162, p. 156, 1987.

CHOMCZYNSKI, P; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, London, v. 1, p. 581-585, 2006.

CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, Washington, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989.

CIOLI, D. *et al.* Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology*, New York, v. 34, n. 8, p. 979–987, 2004.

CLAASSEN, M. A. *et al.* Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 52, p. 315-321, 2010.

COBBOLD, S. P. *et al.* Induction of FoxP3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *Journal of Immunology*, Baltimore, n. 172, p. 6003-6010, 2004.

COLIGAN, J. E. *et al.* Preparation of human mononuclear cell populations and subpopulations. *Current Protocols in Immunology*, New York, v. 2, p. 711-713, 2002.

COLLISON, L. W. *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Reviews- Immunology*, London, v. 11, p. 1093-1101, 2010.

CONCEIÇÃO, M. J. *et al.* Prognosis of schistosomiasis mansoni patients infected with hepatitis B virus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, p. 255-258, 1998.

CONTIGLI, C. *et al.* Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms. *Clinical Immunology*, Orlando, v. 91, p. 338-344, 1999.

COOPER, S. *et al.* Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, Cambridge, v. 10, p. 439-449, 1999.

COSTA, L. B. *et al.* Effect of host-related factors on the intensity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 6, n. 5, p. 219-224, 2002.

COUPER, K. N. *et al.* IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 180, p. 5771-5777, 2008.

COX, A. L. *et al.* Rare birds in North America: Acute Hepatitis C Cohorts. *Gastroenterology*, Baltimore, v. 136, p. 26-31, 2009.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. *et al.* Adaptive FoxP3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*, Cambridge, n. 29, p. 114-126, 2008.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. *et al.* CD25⁻ T cells generate CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *Journal of Immunology*, Baltimore, n. 173, p. 7259-7268, 2004.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive FoxP3⁺ regulatory T cells: More of the same or a division of labor? *Immunity*, Cambridge, v. 30, p. 626-635, 2009.

DA SILVA FILHO, A. A. *et al.* In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy Research*, London, v. 22, p. 1307-1310, 2008.

DAVIDSON, T. S. *et al.* Cutting Edge: EL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 178, p. 4022-4026, 2007.

- DE'BROSKI, R. H. *et al.* IL-10 and TGF- β redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 181, p. 7214-7220, 2008.
- DELAROCHE-ASTAGNEAU, E. *et al.* An incident case-control study of modes of hepatitis C virus transmission in France. *Annals of Epidemiology*, New York, v. 17, p. 755-762, 2007.
- DIAMENT, D. Epidemiological aspects of hepatitis C in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 1, n. 5, p. 6-7, 2007.
- DIEPOLDIER, H. M. New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Antiviral Research*, Amsterdam, v. 82, p. 103-109, 2009.
- DIPAULO, R. J. *et al.* Autoantigen-specific TGF-Beta-induced FoxP3⁺ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 179, p. 4685-4693, 2007.
- DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 20, n. 1, p. 35-39, 2004.
- DOLGANIUC, A.; SZABO, G. T cells with regulatory activity in hepatics C virus infection: what we know and what we don't. *Journal of Leukocyte Biology*, Winston-Salem, v. 84, p. 1-9, 2008.
- DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed.). *Esquistosomose mansônica*. Recife: Universitária, 1994, cap. 5, p. 91-105.
- EBINUMA, H. *et al.* Identification and *in vitro* expansion of functional antigen-specific CD25+FOXP3⁺ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 81, p. 5043-5053, 2008.
- EDWARDS, M. J. *et al.* Reciprocal immunomodulation in a schistosome and hepatotropic virus coinfection model. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 175, p. 6275-6285, 2005.
- ELDIN, N. S. *et al.* Symptomatic Acute Hepatitis C in Egypt: Diagnosis, Spontaneous Viral Clearance, and Delayed Treatment with 12 Weeks of Peguylated Interferon Alfa-2a. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 3, p. 408, 2008.
- EL-KADY, I. M. *et al.* Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-18 and IFN- γ cytokines pattern in patients with combined hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* infections. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oslo, v. 61, p. 87-91, 2005.

- EL-SAYED, H. F. et al. The prevalence of hepatitis B and C infections among immigrants to a newly reclaimed area endemic for *Schistosomiasis mansoni* in Sinai, Egypt. *Acta Tropica*, Basel, v. 68, p. 229-237, 1997.
- EL-ZAYADI, A. R. et al. Hepatocellular carcinoma in Egypt: a single center study over a decade. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 11, p. 5193-5198, 2005.
- FALLON, P. G. et al. Schistosome Infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 164, p. 2585-2591, 2000.
- FANTINI, M. C. et al. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺Cd25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of Immunology*, Baltimore, n. 172, p. 5149-5153, 2004.
- FARCI, P. et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of viral quasispecies. *Science*, Washington, v. 288, p. 339-344, 2000.
- FARID, A. et al. Schistosoma infection inhibits cellular immune responses to HCV core peptides. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 27, p. 189-196, 2005.
- FATHMAN, C. G.; LINEBERRY, N. B. Molecular mechanisms of CD4⁺ T-cell anergy. *Nature Reviews – Immunology*, London, v. 7, p. 599-609, 2007.
- FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, DF, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 28, p.290-298.
- FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 473-487, 2004.
- FERRI, S. et al. Redistribution of regulatory T-cells across the involving stages of chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease*, Roma, v. 43, p. 807-813, 2011.
- FREEMAN, A. J. et al. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 10, p. 285-293, 2003.
- FU, J. et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*, Baltimore, v. 132, p. 2328-2339, 2007.

FULLER, M. J. *et al.* Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology*, Baltimore, v. 51, p. 378-387, 2010.

FUNG, S. K.; LOK, A. S. F. Update in viral hepatitis in 2004. *Current Opinion in Gastroenterology*, Philadelphia, v. 21, p. 300-307, 2005.

FURTADO, G. C. *et al.* Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function. *Journal of Experimental Medicine*, New York, n. 196, p. 851-857, 2002.

GABRYSOVA, L. *et al.* Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF- β dependent differentiation and maintenance of Foxp3⁺ regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 41, p. 1242-1248, 2011.

GAD *et al.* Relationship between hepatitis C virus infection and schistosomal liver disease: not simply an additive effect. *Journal of Gastroenterology*, Tokyo, v. 36, p. 753-758, 2001.

GAMBINERI, E.; TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and x-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology*, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 430-435, 2003.

GAO, Y. *et al.* Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Genes and Immunity*, v. 13, p. 1-13, 2012.

GHANY, M. G. *et al.* Diagnosis, management and treatment of hepatitis C : an update. *Hepatology*, Baltimore, v. 49, p. 1335-1374, 2009.

GILLEECE, Y. C. *et al.* Transmission of hepatitis C virus among HIV-positive homosexual men and response to a 24-week course of pegylated interferon and ribavirin. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Hagerstown, v. 40, p. 41-6, 2005.

GRABOWSKA, A. M. *et al.* Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 31, p. 2388-2394, 2001.

GRAINGER, J. R. *et al.* Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *Journal of Environmental Medicine*, Chichester, v. 27, p. 2331-2341, 2010.

GRAVANO, D. M.; VIGNALI, D. A. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 69, p. 1997-2008, 2012.

- GREEN, E. A. *et al.* CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF- β receptor interactions in type-1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 100, p. 10878-10883, 2003.
- GRUENER, N. H. *et al.* Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *Journal of Virology*, Washington, v. 75, p. 5550-5558, 2001.
- GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. *Lancet*, London, v. 368, p. 116-1118, 2006.
- GRZYCH, J. M. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 146, p.1322-1327, 1991.
- GUPTA, S.; SHANG, W.; SUN, Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arquívum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, Warsaw, v. 56, n. 2, p. 85-102, 2008.
- HASSAN, M. M. *et al.* The role of hepatitis C in hepatocellular carcinoma: a case control study among Egyptians patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, Beijing, v. 33, p. 123-126, 2001.
- HELLER, T.; REHERMANN, B. Acute Hepatitis C: a multifaceted disease. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 25, p. 7-17, 2005.
- HESSE, M. *et al.* Differential regulation of oxide nitric synthase-2 and arginase-1 by Type 1/Type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 167, p. 6533-6544, 2001.
- HESSE, M. *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 172, p. 3157–3166, 2004.
- HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 164, p. 6406-6416, 2000.
- HOWE, C. J. *et al.* Association of sex, hygiene and drug equipment sharing with hepatitis C virus infection among non-injecting drug users in New York City. *Drug and Alcohol Dependence*, Limerick, v. 79, n. 3, p. 389-395, 2005.
- HSIEH, C. S. *et al.* Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Nature Immunology*, New York, n. 7, p. 401-410, 2004.

HUEHN, J.; POLANSKY, J. K.; HADMANN, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?. *Nature reviews – Immunology*, London, v. 9, p. 83-89, 2009.

HUGGINS, D. W.; SANTOS, A. Q. Esquistossomose mansônica: fase aguda. In: *Esquistossomose Mansônica*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 1994. cap. 5, p. 81-89.

IRVING, W. L. *et al.* Acute HCV virus infection. *Euro Surveillance*, Saint-Maurice, v. 13, p. 1-4, 2008.

JANEWAY, C. A. J. *et al.* Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JITTIWUTIKARN, J. *et al.* Hepatitis C infection among drug users in Northern Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 74, n. 6, p. 1111-1116, 2006.

JONULLEIT, H.; SCHIMIDT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 171, p. 6323-6327, 2003.

KAMAL, S. M. Acute Hepatitis C: A systematic Review. *American Journal of Gastroenterology*, New York, v. 103, p. 1283-1297, 2008.

KAMAL, S. M. *et al.* Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4⁺ T-cell and cytokine response. *Gastroenterology*, Baltimore, v. 121, p. 646–656, 2001a.

KAMAL, S. M. *et al.* Clinical, virological and histopathological features: long-term follow-up in patients with chronic hepatitis C co-infected with *S. mansoni*. *Liver International*, Oxford, v. 20, n. 4, p. 281-289, 2000a.

KAMAL, S. *et al.* Interferon therapy in patients with chronic hepatitis C and schistosomiasis. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 32, p. 172-174, 2000b.

KAMAL, S. M. *et al.* Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4⁺ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 189, p. 1140-1150, 2004.

KAMAL, S. M. *et al.* Specific cellular immune response and cytokine patterns in patients coinfecting with hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni*. *Journal of Infection Disease*, Chicago, v. 184, p. 972–982, 2001b.

KAMAL, S. M.; KHALIFA, K. E. S. Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 28, p. 483-496, 2006.

KAMEL, M. A. *et al.* The epidemiology of *Schistosoma mansoni*, hepatitis B and hepatitis C infection in Egypt. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Liverpool, v. 88, n. 5, p. 501-509, 1994.

KLENERMAN, P.; THIMME, R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut*, London, v. 61, p. 1226-1234, 2012.

LACERDA, C. M. *et al.* Prevalência do anti-HCV e de marcadores do vírus B na esquistossomose hepatoesplênica. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, v. 38, p. 30-32, 1993.

LANGHANS, B. *et al.* Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clinical Science*, London, v. 119, p. 97-109, 2010.

LAYLAND, L. E. *et al.* Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 184, p. 713-724, 2010.

LECHNER, F. *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 191, p. 1499-1512, 2000.

LE-GUILLOU-GUILLEMETTE, H. *et al.* Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 13, p. 2416-2426, 2007.

LENG, Q. *et al.* Increased TGF- β , Cbl-b and CTLA-4 levels and immunosuppression in association with chronic immune activation. *International Immunology*, Oxford, v. 18, p. 637-644, 2006.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. TGF-Beta: a master of all T cell trades. *Cell*, Cambridge, v. 134, p. 392-404, 2008.

LI, M. O.; SANJABI, S.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, Cambridge, v. 25, p. 455-471, 2006.

LI, S. *et al.* Analysis of FOXP3⁺ regulatory T cells that display apparent viral antigen specificity during chronic hepatitis C virus infection. *Plos Pathogens*, San Francisco, v. 5, n. 12, p. 1-13, 2009.

LI, S. *et al.* Defining target antigens for CD25⁺FOXP3⁺ IFN- γ regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology*, Adelaide, v. 85, p. 197-204, 2007.

LI, S. *et al.* Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *Journal of Virology*, Washington, n. 82, p. 21-30, 2008.

LIU, Y. *et al.* A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, New York, n. 9, p. 632-640, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, [s. l.], v. 25, p. 402-408, 2001.

LOSIKOFF, P. T.; SELF, A. A.; GREGORY, S. H. Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. *Virulence*, v. 3, n. 7, p. 1-11, 2012.

MACDONALD, A. J. *et al.* CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 185, p. 720-727, 2002.

MAIA, M. *Hiperesplenismo na esquistossomose mansônica: o baço e as células sanguíneas antes e depois da esplenectomia*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Regulation of the immune response by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews – Immunology*, London, v. 3, p. 733-743, 2003.

MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V. Etiologia. In: MALTA, J. (Ed.). *Esquistossomose mansônica*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 1994. cap. 2, p. 25-38.

MAMURA, M. *et al.* CD28 disruption exacerbates inflammation in TGF- $\beta 1^{-/-}$ mice: in vivo suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells independent of autocrine TGF- $\beta 1$. *Blood*, New York, v. 103, p. 4594-4601, 2002.

MANIGOLD, T. *et al.* FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood Cells*, Berlim, v. 107, p. 4424-4432, 2006.

MARIE, J. C.; LIGGITT, D.; RUDENSKY, A. Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity*, Cambridge, n. 25, p. 441-454, 2006.

MARTINEZ-BAUER, E. *et al.* Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 48, p. 20-27, 2008.

MATTOS, A. A.; DANTAS-CORRÊA, E. B. *Tratado de Hepatologia*. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MAYNARD, C. L. *et al.* Regulatory T cells expressing interleukin-10 develop from FoxP3⁺ and FoxP3⁻ precursor cells in the absence of interleukin-10. *Nature Immunology*, New York, v. 8, p. 931-941, 2007.

MCGEACHY, M. J.; STEPHENS, L. A.; ANDERTON, S. M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells within the central nervous system. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 175, p. 3025-3032, 2005.

MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *Journal of Immunology*, Baltimore, p. 1224-1231, 2004.

MCSORLEY, H. J. *et al.* Expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite, *Brugia malayi*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 181, p. 6456-6466, 2008.

MEIRA, M. R. L. *et al.* Surgical hepatosplenic schistosomiasis and hepatitis B: a serological, histological and immunohistochemical study of 30 cases. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, v. 44, p. 77-81, 1999.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia*, São Paulo, v. 32, p. 184-188, 2009.

METENOU, S. *et al.* At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 184, p. 5375-5382, 2010.

MIKHAIL, N. M. *et al.* Prospective study of cross-infection from upper GI endoscopy in a hepatitis-C-prevalent population. *Gastrointestinal endoscopy*, Denver, v. 65, p. 584-588, 2007.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection: *Nature Reviews – Immunology*, London, v. 4, p. 841-855, 2004.

MISHIRO, S. *et al.* Na autoantibody cross-reactive to hepatitis C virus core and a host nuclear antigen. *Autoimmunity*, Basel, v. 10, p. 269-273, 1991.

MISSALE, G. *et al.* Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 98, p. 706-714, 1998.

MISSALE, G. *et al.* Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? *Digestive and Liver Disease*, Roma, v. 36, p. 703-711, 2004.

MIYAAKI, H. *et al.* Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients. *Liver International*, Oxford, v. 29, p. 702-707, 2009.

MONTENEGRO, S. M. L. *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of Interferon- γ and Interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 179, p.1502–14, 1999.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORAIS, C. N. L. *Avaliação da relação entre marcadores biológicos com os graus de fibrose no complexo hepatite C e esquistossomose.* 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, 2007.

MORGAN, M. E. *et al.* Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory Cells in humans. *Human Immunology*, New York, v. 66, p. 13-20, 2005.

MOTTET, C.; UHLIG, H. H. POWRIE, F. C. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 170, p. 3939-3943, 2003.

MOURÃO, L. C. S. *et al.* Caracterização da hepatite C em pacientes assistidos pelo Programa de Medicamentos de Dispensação em caráter excepcional. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 226-229, 2008.

MUDAWI, H. M. Y. *et al.* Epidemiology of HCV infection in Geriza State of Central Sudan. *Journal of Medical Virology*, New York, v. 79, p. 383-385, 2007a.

MUDAWI, H. M. *et al.* Prevalence and common genotypes of HCV infection in Sudanese patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Journal of Medical Virology*, New York, v. 79, n. 9, p. 1322-1324, 2007b.

MWATHA, J. K. *et al.* High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1 and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 160, p. 1992-1999, 1998.

NAGHETTINI, A. V. *et al.* Soroprevalência do vírus da hepatite C na população em diálise de Goiânia, GO. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 30, p. 113-117, 1997.

NAPOLI, J. *et al.* Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology*, Baltimore, v. 24, p. 759-765, 1996.

NAUSCH, N. *et al.* Regulatory and activated T cells in human Schistosoma haematobium infection. *Plos One*, San Francisco, v. 6, e16860, 2011.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana.* 9. ed. São Paulo: Ateneu, 1995.

O'CONNOR PG. Alcohol abuse and dependency. *American College of Physicians*, Philadelphia, p. 1-14, 2009.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine*, New York, v. 10, p. 801-805, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Mortality database*. Disponível em: <<http://www.who.int/en>> Acesso em: 20 maio 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Ultrasound in schistosomiasis*. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity. Second International Workshop. Niamey, 1996.

OSWALD, I. P. *et al.* Interleukin-10 inhibits macrophage microbial activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor- α required as a costimulatory factor for interferon- γ -induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 89, p. 8676-8680, 1992.

PAWLOTSKY, J. M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*, Baltimore, v. 36, p. 65-73, 2002.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The Immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, London, v. 2, p. 499-511, 2002.

PEISELER, M. *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 57, p. 125-132, 2012.

PENIDO, M. L.; COELHO P. M.; NELSON D. L. Efficacy of a new schistosomicidal agent 2-[(methylpropyl)amino]-1-octanethiosulfuric acid against an oxamniquine resistant *Schistosoma mansoni* isolate. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 6, p. 811–813, 1999.

PEREIRA, L. M. *et al.* Hepatite B e C na esquistossomose mansoni. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva*, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 71-77, 2001.

PEREIRA, L. M. *et al.* Hepatitis C virus infection in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Journal of Medical Virology*, New York, v. 45, p. 423-428, 1995.

PICCIRILLO, C. A. *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor- β 1 production and responsiveness. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 196, p. 1-10, 2002.

PONTIN, K. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*, Berlim, v. 103, p. 487–492, 2008.

- PORDEUS, L. C. *et al.* A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.
- POYNARD, T. *et al.* Viral Hepatitis C. *Lancet*, London, v. 362, p. 2095-2100, 2003.
- RABELO, A. Diagnosing Schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 669-676, 1997.
- RAIA, S.; MIES, S.; ALFIERI, F. Portalhypertension in mansonic schistosomiasis. *World Journal of Surgery*, New York, v. 15, p. 176-187, 1991.
- READ, S. *et al.* Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function *in vivo*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 177, p. 4376-4383, 2006.
- REHERMANN, B; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature*, London, v. 5, p. 215-229, 2005.
- RESENDES, A. P. C.; SOUZA-SANTOS, R.; BARBOSA, C. S. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992-2000. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1392-1401, 2005.
- REY, L. *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. Schistosomiasis — a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitology Research*, Berlin, v. 99, n. 5, p. 505–521, 2006.
- RUSHBROOK, S. M. *et al.* Regulatory T cells suppress *in vitro* proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 79, p. 7852-7859, 2005.
- SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, Cambridge, n. 133, p. 775-787, 2008.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nature Immunology*, New York, v. 6, p. 345-352, 2005.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells. *Seminary of Immunopathology*, [s. l.], v. 28, p. 1-2, 2006.
- SANTANTONIO, T.; WIEGAND, J.; GERLACH, J. T. Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 49, p. 623-633, 2008.

- SCHWARTZ, R. H. T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 21, p. 305-334, 2003.
- SEEFF, L. B. The history of the natural history of hepatitis c (1968-2009). *Liver International*, Oxford, v. 29, p. 89-99, 2009.
- SEMNANI, R. T. *et al.* Filarial antigens impair the function of human dendritic cells during differentiation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, Hong Kong, v. 69, p. 5813-5822, 2001.
- SERUFO, J. C.; LAMBERTUCCI, J. R. Esquistossomose e hepatites virais: uma revisão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 30, p. 313-322, 1997.
- SHEVACH, E. M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews - Immunology*, London, v. 2, p. 389-400, 2002.
- SHEVACH, E. M. Mechanisms of FOXP3⁺ T regulatory Cell-mediated suppression. *Immunity*, Cambridge, v. 30, p. 636-645, 2009.
- SHI, Z.; WAKIL, A. E.; ROCKEY, D. C. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 94, p. 10663-10668, 1997.
- SHIHA, Z.; ZALATA, R. K. Does schistosomiasis interfere with application of the knodell score for assessment of chronic hepatitis C? *Medical Science Monitor*, Warsaw, v. 8, n. 2, p. Cr72-77, 2002.
- SILVA, J. F. A. HBV an HCV serological markers in patients with the hepatosplenic form of mansonic schistosomiasis. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 124-130, 2011.
- SILVA, J. L. A. *et al.* Soroprevalência da hepatite C em pacientes com esquistossomose. *Revista Paraense de Medicina*, Belém, p. 22, n. 1, p. 27-32, 2008.
- SILVEIRA, A. M. *et al.* Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon- γ and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulates cultures. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 98, p. 514-519, 2004.
- SIMMONDS, P *et al.* Proposed system for the nomenclature hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, Baltimore, v. 19, n. 5, p. 1321-1324, 1994.
- SINGH, K. P. *et al.* Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*, Oxford, v. 114, p. 410-417, 2005.

SMITH, K. A. *et al.* Chronic helminth infection mediates tolerance in vivo through dominance of CD11c^{low} CD103⁻ CD population. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 186, p. 7098-7109, 2011.

SMITHERS, S. R.; DOENHOFF, M. J. Schistosomiasis. In: COHEN, S.; WARREN, K. S. *Immunology of Parasitic Infections*. 2. ed. Oxford: Blackwell, 1982. p. 527-607.

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, Oxford, v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.

SONG, B. C. *et al.* Transformin growth factor beta-1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma. *Cancer*, Philadelphia, v. 94, p. 175-180, 2002.

SORCI, G.; CORNET, S.; FAIVRE, B. Immune evasion, immunopathology and the regulation of the immune system. *Plos Pathogens*, San Francisco, v. 2, p. 71-91, 2013.

SORIANO, V. *et al.* Hepatitis C and HIV infection: biological, clinical and therapeutic implications. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v. 31, suppl. 1, p. 119-123, 1999.

STRADER D. B. *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, Baltimore, v. 39, p. 1147–1171, 2004.

STRAUSS, E. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 34, suppl. 1, p. 69-82, 2001.

SUFFIA, I. J. *et al.* Infected site-restricted FoxP3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 203, p. 777-788, 2006.

SUK, K.; KIM, S. Y.; KIM, H. Regulation of IL-18 production by IFN- γ and PGE₂ in mouse microglial cells: involvement of NF-KB pathway in the regulatory processes. *Immunology Letters*, Amsterdam, v. 77, p. 79-85, 2001.

SUNG, V. M. *et al.* Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 77, n. 3, p. 2134-2146, 2003.

SUVAS, S. *et al.* CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 198, p. 889-901, 2003.

TAAMS, L. S. *et al.* Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*, Oxford, v. 118, p. 1-9, 2006.

TANG, Q. *et al.* Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in non-obese diabetic mice. *Nature Immunology*, New York, v. 7, p. 83-92, 2006.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The FOXP3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, New York, v. 9, p. 239-244, 2008.

TAYLOR, M. D. *et al.* Early recruitment of natural CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 39, p. 192-206, 2009.

TAYLOR, M. D. *et al.* Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 174, p. 4924-4933, 2005.

TAYLOR, M. D.; WERF, N.; MAIZELS, R. M. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends in Immunology*, Oxford, v. 33, n. 4, p. 181-189, 2012.

TAYLOR, J. J.; MOHRS, M.; PEARCE, E. J. Regulatory T cell response develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the effector population. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 176, p. 5839-5847, 2006.

TAYLOR, J. J. *et al.* Th2 cell hyporesponsiveness during chronic murine schistosomiasis is cell intrinsic and linked to GRAIL expression. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 119, p. 1019-1028, 2009.

TESTER, I. *et al.* Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 201, p. 1725-1731, 2005.

THE METAVIR COOPERATIVE GROUP. Inter- and intra observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology*, Baltimore, v. 20, p. 15-20, 1994.

THIMME, R. *et al.* Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 99, p. 15661-15668, 2002.

THOMAS, D. L.; SEEF, L. B. Natural History of Hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, Maryland Heights, v. 9, p. 383-398, 2005.

THOMSON, B. J.; FINCH, R. G. Hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection*, Oxford, v. 11, p. 86-94, 2005.

TORGERSON, T R.; ORCHS, H. D. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, Hagerstown, v. 7, p. 515-521, 2007.

TSAI, S. L. *et al.* Detection of type 2-like T helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*, Baltimore, v. 25, p. 449-458, 1997.

TSENG, K. C. *et al.* Elevated frequency and function of regulatory T cells in patients with active chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology*, Tokyo, v. 47, p. 823-833, 2012.

TURNER, J. D. *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by Schistosome infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 5, p. 1-11, 2011.

TURNER, M. S.; KANE, L. P.; MOREL, P. A.. Dominant role of antigen dose in CD4⁺FOXP⁺ regulatory T cell induction and expansion. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 183, p. 4895-4903, 2009.

ULSENHEIMER, A. *et al.* Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, Baltimore, v. 37, p. 1189-1198, 2003.

UNITT, E. *et al.* Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of regulatory T cells. *Hepatology*, Baltimore, v. 41, p. 722-730, 2005.

VALENTE *et al.* Marcadores sorológicos das hepatites B e C em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 38, n. 6, p. 488-492, 2005.

VAN DER WERF, N. *et al.* Th2 responses to helminth parasites can be therapeutically enhanced by, but are not dependent upon, GITR-GITR ligand costimulation in vivo. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 187, p. 1411-1420, 2011.

VIANA, I. R. *et al.* Interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 88, p. 466-470, 1994.

VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*, New York, v. 6, p. 338-344, 2005.

WANG, S. C. *et al.* Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 273, p. 302-308, 1998.

WASLEY, A.; GRYTDAL, S.; GALLANGHER, K. Center for Disease Control and Prevention. Surveillance for acute viral hepatitis – United States 2006. *MMWR CDC Surveillance Summaries*, Atlanta, v. 57, p. 1-24, 2008.

WATANABE, K. *et al.* Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 114, p. 410-417, 2009.

WHERRY, E. J. T cell exhaustion. *Nature Reviews – Immunology*, London, v. 131, p. 492-499, 2011.

WILSON, M. S. *et al.* Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 202, p. 1199-1212, 2005.

WODARZ, D.; KLENEMAN, P.; NOWAK, M. A. Dynamics of cytotoxic T-lymphocyte exhaustion. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B - Biological sciences*, London, v. 265, p. 191-203, 1998.

WYNN, T. A. *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews*, Copenhagen, v. 201, p. 156-167, 2004.

YAGI, H. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *International Immunology*, Oxford, v. 16, p. 1643-1656, 2004.

YOSHIZAWA, K. *et al.* Expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, Amsterdam, v. 40, p. 179-187, 2010.

ZACCONE, P. *et al.* Immune modulation by *Schistosoma mansoni* antigens in NOD mice: effects on both innate and adaptive immune systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Cairo, v. 2010, p. 1-11, 2010.

ZHENG, S. G. *et al.* Natural and induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells educate CD4⁺CD25⁻ to develop suppressive activity: The role of IL-2, TGF- γ , and IL-10. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 172, p. 5213-5221, 2004.

ZHENG, Y.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*, New York, n. 8, p. 457-462, 2007.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity*, Cambridge, v. 30, p. 646-655, 2009.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética



Título do Projeto: Avaliação do perfil de células T regulatórias na hepatite C, na esquistossomose e co-infecção.

Pesquisador responsável: Daniele Silva de Moraes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 19/05/09

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 20/09

Registro no CAAE: 0018.0.000.095-09

PARECER Nº 29/2009

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 10 de agosto de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 10 de agosto de 2009.

Daniele Campozana Gouveia



Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 10/08/2010.

Comitê de Ética em Pesquisa - CPqAM/Fiocruz
 CEP nº 670/20 Fone: (81) 2101.2635
 Fax: (81) 3423.1911 - 3101.2629
 Rua: R. Almeida
 comitetedeticapqam@fiocruz.br



ANEXO B – Aprovação do artigo submetido à publicação

Mensagem de Impressão do Hotmail

<http://by170w.bay170.mail.live.com/mail/PrintMessages.aspx?cpids=b...>

ENC: RSP - Artigo aceito

De: **Silvia Montenegro** (silvia@cpqam.focruz.br)
 Enviada: terça-feira, 17 de julho de 2012 20:05:28
 Para: 'Daniele Van-Lume' (dani_lume@hotmail.com)
 Cc: clarice@cpqam.focruz.br; epalopes@uol.com.br; alexandre.ign@gmail.com; 'Fatima Militao' (militao@cpqam.focruz.br)

Colegas,

Encaminho a resposta da revista, aceitando o artigo!!!!.

Abraços,

Silvia

De: RSP [mailto:root@mzo.com.br]
 Enviada em: domingo, 15 de julho de 2012 18:56
 Para: silvia@cpqam.focruz.br
 Cc: rspline@fsp.usp.br
 Assunto: RSP - Artigo aceito

Manuscrito nº 4247

Prezada Colaboradora Silvia Maria Lucena Montenegro

Temos a satisfação de comunicar-lhe, em nome da Editoria Científica, que ao término da etapa do processo de avaliação por pares externos, seu manuscrito intitulado "Association between schistosomiasis mansoni and hepatitis C in the world: a systematic review.", em sua versão final, foi aprovado quanto ao mérito.

Na sequência, seu manuscrito será encaminhado para a Equipe de Redação para ser preparado para publicação. Nessa etapa, a RSP se reserva o direito de fazer alterações e sugestões na redação científica, incluindo revisão gramatical e de estilo, visando a uma perfeita comunicação aos leitores. O manuscrito, com as alterações introduzidas, será encaminhado para sua revisão.

Para ser efetivada a publicação do artigo, será imprescindível o envio do documento de Transferência de Direitos Autorais assinado por todos os autores e escaneado, por e-mail, para rspline@fsp.usp.br.

Solicitamos que aguarde nosso próximo contato na fase de preparo do manuscrito para publicação.

Agradecemos pela sua valiosa contribuição a esta Revista e esperamos continuar contando com outras contribuições de sua autoria.



APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para o paciente

Eu, _____ declaro que aceito participar do estudo científico: “AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE C, NA ESQUISTOSSOMOSE E NA COMORBIDADE”. Foi-me explicado que faz parte de minha participação neste estudo um exame médico completo, exames de sangue, ultrassonográficos, parasitológicos de fezes e também biópsia de fígado, se eu estiver com suspeita de hepatite C, que serão realizados antes do início do tratamento. Os riscos de retirar sangue são dor e hematoma local e muito raramente, pode ocorrer desmaio. A quantidade de sangue a ser retirada será cerca de 6 colheres de chá (30 ml) e não deve causar problemas para a minha saúde. Outro exame que será feito é a retirada de um pequeno pedaço do meu fígado (biópsia) que será analisado. Durante esse exame poderá haver sangramento excessivo no local, porém isso não deverá ocorrer porque antes farei testes de coagulação sanguínea. Minha participação nesse estudo vai me beneficiar direta e indiretamente, possibilitando o melhor entendimento das doenças e conseqüentemente melhoria do diagnóstico e da assistência prestadas a mim. Essa participação é voluntária e eu poderei deixar este estudo a qualquer momento se assim desejar. Os materiais biológicos obtidos nesse projeto serão arquivados em um banco de amostras, podendo ser utilizados em estudos relacionados à imunologia e bioquímica. Caso não queira participar, minha decisão não vai mudar meu atendimento médico ou tratamento neste hospital ou clínica, agora ou no futuro. Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Esse termo de consentimento será feito em duas vias para que uma delas permaneça comigo. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com qualquer uma das pessoas da equipe médica a qualquer momento, pessoalmente ou pelos telefones abaixo:

Dr^a. Silvia Maria Lucena Montenegro. Fone: (81) 2101-2565

Dr^a. Clarice N.Lins de Moraes. Fone : (81) 2101-2561

Dr. Edmundo Pessoa Lopes. Fone : (81) 3227-0927/ (81) 9964-8308

Dr^a. Ana Lúcia Coutinho. Fone: (81) 3227-0927/ (81) 9272-0218

Recife, _____ de _____ de 20 ____ .

Assinatura do Participante

Assinatura do(a) Pesquisador(a) Responsável

Daniele Silva de Moraes Van-Lume

Biomédica e Doutoranda em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Telefone para contato: (81) 2101-2566/ (81) 9173-6572.



APÊNDICE C – Modelo de questionário epidemiológico
FICHA CADASTRAL DE INDIVÍDUOS DO PROJETO DE DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA
“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA HEPATITE C, NA ESQUISTOSSOMOSE E NA
COMORBIDADE”.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: DANIELE S. DE MORAES VAN-LUME.

GRUPO: () Hepatite C () Esquistossomose () Co-infectado () Controle negativo

Data de inserção na pesquisa: ____/____/____.

1) Número do prontuário:

2) Nome completo: _____

3) Idade: Data de nascimento: ____/____/____.

4) Sexo: () Masculino () Feminino

5) Raça: () Branca () Negra () Amarela () Parda () Índia

6) Anos de estudo: _____ anos.

7) Endereço: _____

Fone:

8) Hepatite C: () Sim Tempo de infecção:
() Não

FATORES DE RISCO	SIM	NÃO
Hemotransusão		
Receptor de fator de coagulação antes de 1987		
Hemodiálise		
Compartilhamento de seringas		
Presença de tatuagem ou piercings		
Acupuntura		
Práticas sexuais sem preservativo		
Internações hospitalares		
Procedimentos odontológicos		
Profissional da área de saúde		
Causa desconhecida		



- 9) Biópsia hepática: () Sim () Não
- a) Grau de fibrose (classificação METAVIR): () F0 - Sem fibrose () F1 - Fibrose portal sem septos
() F2 - Fibrose portal com poucos septos () F3 - Fibrose portal com numerosos septos sem cirrose
() F4 - Cirrose
- b) Atividade inflamatória: () A0 - Sem atividade inflamatória () A1 - Atividade inflamatória leve
() A2 - Atividade inflamatória moderada () A3 - Atividade inflamatória severa
- 10) Esquistossomose: () Sim Tempo de infecção:
() Não

FATORES DE RISCO	SIM	NÃO
Morador de área rural		
Histórico de banho de rio		
Atividades de lazer (pesca/nadar) em rios		
Lavagem de roupas e utensílios em rios		
Saneamento básico (presença de fossas, esgotos, coleta de lixo)		
Água encanada na residência		
Presença de banheiro intradomiciliar		
Consumo de água tratada para beber (clorada e/ou fervida e/ou filtrada)		

Iniciou tratamento para esquistossomose: () Sim Data de início: ____/____/_____
() Não

11) Resultado da Ultrassonografia Abdominal (USG) (classificação de Niamey):

Grau de fibrose: () A – Ausência de fibrose () B – Fibrose duvidosa () C – Fibrose periférica
() D – Fibrose central () E – Fibrose avançada () F – Fibrose muito avançada

Média fibrose:

Padrão fibrose:

Baço Longitudinal:

Veia Porta:



12) Resultados dos exames laboratoriais:

EXAME	RESULTADO
Anti-HCV	
HCV RNA	
HCV Genótipo	
Anti-HBc	
Anti-HIV I e II	

13) Resultado do parasitológico de fezes: () Positivo () Negativo

Hoffmann:

Kato-Katz:

14) Critérios de exclusão:

CRITÉRIOS (presença de)	SIM	NÃO
Insuficiência renal		
Insuficiência cardíaca		
Doença auto-imune		
Diabetes insulino-dependente		
Hepatocarcinoma em quimioterapia		
Hepatopatias de outras etiologias		
Infecção por HIV e/ou HBV		
Uso de imunossupressores		
Transplante de órgão		
Ingestão freqüente de álcool nos últimos 6 meses		

APÊNDICE D – Artigo aceito para publicação

Title: Association between schistosomiasis mansoni and hepatitis C in the world: a systematic review.

Título: Associação entre esquistossomose mansônica e hepatite C no mundo: uma revisão sistemática.

Running title: HCV/S. *mansoni* association: systematic review.

Descritores: Hepatitis C; Schistosomiasis; Prevalence; Risk Factors

Authors:

Daniele Silva de Moraes Van-Lume.

Doutoranda em Ciências com ênfase Saúde Pública do Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/FIOCRUZ, Recife-Pernambuco.

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Doutora em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ), Pesquisadora Titular do Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE.

Alexandre Ignácio de Souza

Biomédico formado pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE.

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes

Doutor em Gastroenterologia pela Universidade Federal de São Paulo, Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Doutora em Ciências com ênfase em Saúde Pública pelo CPqAM/FIOCRUZ, Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE.

*Silvia Maria Lucena Montenegro

Doutora em Medicina pela Universidade Federal de Pernambuco, Pesquisadora Titular do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE.

Silvia M.L. Montenegro is recipient of CNPq fellowships.

*correspondence to: Silvia Maria Lucena Montenegro, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50;670-420, Recife-PE, Brasil. E-mail: silvia@cpqam.fiocruz.br, Telefone: 55 (81) 2101 2565.

Apoio Financeiro: CPqAM/FIOCRUZ.

1 **ABSTRACT**

2 **Introduction:** The association between hepatitis C and schistosomiasis is a
3 worldwide public health issue due to severe clinical symptoms and high
4 morbidity rates, especially in people who live in developing countries. The aim
5 of this study was to perform a systematic review about the prevalence of this
6 association and the risk factors for hepatitis C virus acquisition in a population
7 infected by *Schistosoma mansoni*. **Methods:** The research was performed
8 through the website www.bireme.br, with route descriptors DeCS/MeSH, and
9 included MEDLINE, LILACS, SciELO, Cochrane Library and IBECs databases.
10 The research terms utilized were “Schistosomiasis mansoni” AND “Hepatitis C”.
11 The criteria for the studies selection and the extraction data were based on
12 systematic review methods. **Results:** 45 studies were found, with nine being
13 excluded in a first screening since they did not fulfill the inclusion criteria.
14 Further analysis of the 36 abstracts led to the exclusion of 14 articles. Of the
15 remaining 22 articles that underwent complete reading, nine were excluded and
16 13 articles were used for data extraction. The HCV infection rates in
17 schistosomiasis populations ranging from 1% in Ethiopia to 50% in Egypt.
18 **Conclusion:** Even in areas where are characterized by the hepatitis C and
19 schistosomiasis association, such as Brazil and Egypt, some studies had poorly
20 methodologies, which do not allow consistent conclusions. The occurrence of
21 these diseases and the risk factors for acquiring HCV were widely variable.
22 Despite the limitations, this review may help to identify regions with higher rates
23 of hepatitis C and schistosomiasis association. However, more studies are
24 necessary for the development of public health policies on prevention and
25 control of these diseases.

26

27 **RESUMO**

28 **Introdução:** A associação entre a hepatite C e esquistossomose é um
29 problema de saúde pública mundial, que usualmente acomete populações de
30 países em desenvolvimento e que pode levar os indivíduos a uma pior
31 morbidade, com graves quadros clínicos. O objetivo deste trabalho foi realizar
32 uma revisão sistemática sobre a ocorrência da associação VHC/ *Schistosoma*
33 *mansoni* e os fatores de risco associados à aquisição do VHC, por indivíduos
34 com esquistossomose. **Métodos:** A revisão foi realizada através do site
35 WWW.bireme.br, via descritores DeCS/MeSH e incluiu as bases de dados
36 MEDLINE, LILACS, SciELO, Biblioteca Cochrane e IBECs. Os termos de
37 pesquisa utilizados foram “Esquistossomose mansoni” E “Hepatite C”. Os
38 critérios de seleção e a obtenção dos dados foram baseados em métodos de
39 revisão sistemática descritos na literatura. **Resultados:** 45 títulos relevantes
40 foram encontrados, com nove estudos excluídos numa primeira triagem pois
41 não preenchiam os critérios de inclusão. Após a análise dos 36 resumos, 14
42 foram excluídos. Dos 22 artigos selecionados para leitura completa, nove foram
43 excluídos por não se encaixarem nos critérios de inclusão e 13 artigos foram
44 utilizados para extração de dados. A prevalência encontrada para esta
45 associação variou de 1% na Etiópia a 50% no Egito. **Conclusão:** Mesmo em
46 áreas já caracterizadas pela associação VHC/*S. mansoni*, como Brasil e Egito,
47 alguns estudos encontrados apresentavam metodologias pouco definidas, o
48 que não permitiu conclusões consistentes. As taxas de infecção pelo VHC em
49 populações esquistossomóticas foram heterogêneas e os fatores de risco para
50 adquirir este vírus foram variáveis, entre os estudos apresentados. Apesar das

51 limitações, esta revisão pode ajudar a identificar regiões com maiores taxas
52 desta associação. No entanto, mais estudos serão necessários para o
53 desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e controle destas doenças.

54

55 INTRODUCTION

56

57 Schistosomiasis is the second most important parasitic infection after
58 malaria and affects more than 200 million people in 74 countries in the world.⁵⁶
59 In many countries, especially those in Africa, such as Egypt¹⁸, Kenya⁹ and
60 Sudan^{27,44}, and in South America, mainly Brazil, schistosomiasis is endemic,
61 with high prevalence and morbidity rates^{1*,38}

62 In the literature, prevalence of schistosomiasis ranged from 15-45% in
63 Egypt and Brazil*.^{18,38} In this country, 6-8 million people are infected with
64 *Schistosoma mansoni* and about 30 million people live under risk of infection*.
65 In some areas of Northeast Brazil, the prevalence of Schistosomiasis mansoni
66 (SM) can reach up to 27 % of the population³⁸, turning this country into a major
67 schistosomiasis endemic area in the world.

68 The diverse clinical patterns observed for this disease depends on many
69 factors, including parasite strain, host genetic background, host nutritional and
70 immunological state, and co-infections.^{9,10,16,31,35} Schistosomiasis may progress
71 to irreversible fibrosis, with granuloma formation, and consequently to digestive
72 hemorrhage followed by severe portal hypertension, characterizing the most
73 advanced stage of disease, the hepatosplenic form (HS), commonly observed
74 in endemic areas.^{28,42,48}

^{1*} Maciel RCR. Enzimas caniculares na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco. 2006; 95 p.

75 When SM comes combined with other hepatic disease, especially the
76 Hepatitis C Virus (HCV) infection, the progression of hepatic fibrosis into
77 cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) can occur in a few years.^{29,40}
78 Concomitant SM and HCV infection is observed in a high frequency in
79 Egypt^{2,7,47} and Brazil.³⁹

80 Hepatitis C is also considered an important public health issue
81 throughout the world, with approximately 3% of people (about 170 million) being
82 infected with the HCV.^{1,2} It is also the most important cause of liver disease and
83 HCC in developed countries, including the United Kingdom and USA^{5,41,53,54},
84 and in developing countries, such as Egypt^{2,25,26} and Brazil.^{6,39,45}

85 In Egypt, estimates are that 8-10 million are infected and 68 million
86 people have been exposed to HCV⁵², showing a prevalence of 10 to 60%,
87 mainly in rural areas.^{15,17,21} In Brazil, the prevalence of HCV infection is lower
88 than in Egypt and varies from 2.5% to 4.9%, corresponding to approximately 3.9
89 to 7.6 million people.¹¹

90 A few studies indicate that, in developing countries, HCV may be
91 implicated as a factor influencing the severity of schistosomiasis. Likewise, an
92 influence of SM on HCV severity has been suggested by some authors.^{29,33,39}

93 Nevertheless, there are many contradictory data about the prevalence
94 HCV/*S. mansoni* co-infection in SM endemic areas and the risk factors
95 associated with increased susceptibility for HCV infection in a *S. mansoni*-
96 infected person, especially in the case of the HS form.^{2,4,7,49}

97 The aim of this study was to perform a systematic review about the
98 prevalence of the HCV/*S. mansoni* co-infection in SM-infected population living
99 in endemic areas. The worldwide relevance of the hepatitis C and

100 schistosomiasis association as a public health issue is mainly due to the severe
101 clinical patterns and high morbidity associated with it, especially in developing
102 countries. This review may help to identify regions where this diseases
103 association is relevant and the risk factors associated with HCV infection, and to
104 aid on the implementation of prevention and control actions.

105

106 **MATERIAL AND METHODS**

107

108 The bibliography research about studies that reported the prevalence of
109 the association between schistosomiasis and hepatitis C worldwide and the risk
110 factors associated with HCV acquisition in a SM population was performed
111 through a systematic research on May30th, 2011. The search terms
112 “Schistosomiasis mansoni” AND “Hepatitis C” were utilized. The website used
113 was www.bireme.br, with route descriptors DeCS/MeSH. MEDLINE, LILACS,
114 SciELO, Cochrane Library and IBECS databases included. This database fulfills
115 the minimum criteria search to conduct a systematic review, according with
116 literature²².

117 Firstly, 45 publications were obtained through the search in website
118 described above and a first screening was performed. The criteria adopted for
119 studies inclusion were:

- 120 • Studies in scientific article formats published on or after 1989, year of
121 HCV discovery;
- 122 • Titles published in English, Spanish or Portuguese with available
123 abstracts;
- 124 • Studies performed with human populations.

125 According to these criteria, nine studies were excluded because they
126 utilized experimental models, were presented as thesis or monograph or were
127 redundant in different databases (Figura 1).

128 A second screening was done by analysis of 36 abstracts selected. At
129 this time, 14 studies were excluded because they did not contain information
130 about the prevalence of HCV/*S. mansoni* association or the risk factors
131 associated with HCV infection in a schistosomiasis population (Fig. 1).

132 Following the two screening rounds described above, a total of 22
133 articles were selected for complete reading. This step was carried out by a pair
134 of reviewers where each one, independent, filled a table with the criteria
135 relevant about the articles selected for data extraction.^{14,22} There was no
136 discordance between the two reviewers in regard to articles selection, with
137 *kappa* index = 1 ($P < 0.05$). The inclusion criteria adopted in this step were:

- 138 • Population: subjects of both sexes infected by *S. mansoni* and living
139 in endemic areas;
- 140 • Age group: older than 18 years-old;
- 141 • Measurement of HCV/*S. mansoni* association: studies that describe
142 the methods utilized to measure the prevalence of HCV and *S.*
143 *mansoni* infections;
- 144 • Risk factors: studies that report the risk factors associated with HCV
145 infection and if there is a correlation with schistosomiasis.

146 Importantly, studies that used only serologic methods to evaluate the
147 prevalence of *S. mansoni* infection were excluded because the distinction
148 between past and present infection is not possible, raising doubts about the
149 confirmed SM diagnosis.²⁰

150 Among the 22 articles selected for the furthest step, 13 filled all inclusion
151 criteria and offered data required for analyze the prevalence of hepatitis C and
152 schistosomiasis association, in SM endemic areas. The reasons for the
153 exclusion of the nine articles in the last screening are shown in Figure 1.
154 1,3,20,24,25,34,49-51

155

156 **RESULTS**

157

158 Table 1, 2 and 3 list the 13 articles that were analyzed.
159 2,6,8,9,19,29,30,32,36,37,39,40,45 Authors, epidemiological data and objective of each
160 paper are listed in Table 1. The population size, the methods utilized to
161 measure HCV and SM infections and the data about the prevalence of the
162 HCV/*S. mansoni* association are shown in Table 2. Finally, the risk factors
163 associated with susceptibility for HCV infection, the results and conclusions of
164 each study can be observed in Table 3.

165 According to our analyses, the prevalence of HCV/*S. mansoni*
166 association ranged from 0.8³⁷ to 50% among the studies, with the highest
167 ranges found in Egypt (10-50%).^{2,9,19,29,30} In Brazil, diseases association rates,
168 although not as high as in Egypt, can be considered relevant due to the high
169 morbidity when HCV is present. When the study was conducted with hospital
170 patients in Brazil, diseases association rates were up to 20%.^{32,39,40}

171 Among the 13 articles included in the final step of the review, 10 (77%)
172 are cross-sectional studies.^{8,9,19,29,30,36,37,39,40,45} Of the three remaining articles,
173 one is a retrospective cases series⁶, one is a prospective cases series² and the
174 other is a cases series with an external control group³². In regards to the study

175 site, five studies (38.4%)^{6,32,39,40,45} were conducted in Brazil, five in
176 Egypt^{2,9,19,29,30}, two in Sudan^{36,37}, one in Ethiopia⁸ and one in Kenya⁹. A higher
177 prevalence of HCV infection was found in the SM population of Egypt, as
178 compared to the other countries (Table 1).

179 Considering the main issues surveyed by the authors, eight
180 studies^{2,6,19,32,36,37,40,45} (61.5 %) sought to determine the serologic prevalence of
181 HCV infection in a SM population, and one study proposed to verify any
182 epidemiologic relationship of schistosomiasis and HBV and HCV serologic
183 markers.³⁰ Moreover, six studies^{6,9,29,37,39,40} (46.15 %) aimed to evaluate the
184 severity of hepatic lesions and morbidity of hepatitis C when associated with
185 SM, and to correlate with serologic markers . The mean age of humans enrolled
186 in these studies was 33.7 years old, and in four articles subjects were over 40
187 years.^{6,29,32,36}

188 All studies were conducted in schistosomiasis endemic countries, which
189 was the main inclusion criterion for this review. The inclusion criteria used by
190 the authors to choose subjects with schistosomiasis were, mainly: people living
191 in endemic areas with positive parasitological exams confirmed by the presence
192 of *S. mansoni* eggs in stool samples or rectal biopsies (8 studies; 61.53%)
193 and/or ultrasonography (US) compatible with periportal fibrosis (PPF) (6
194 studies; 46.15%). The epidemiological history was considered in seven studies
195 (53.84%) to compose diagnosis when in conjunction with one or both criteria
196 mentioned above.

197 The main exclusion criteria adopted for the selected studies for people
198 enrollment was if the person did not live at the study site. Moreover, people with
199 no history of contaminated water contact and/or with liver disease caused by

200 alcohol consumption, autoimmune disorders or by Hepatitis viruses A, B, D or
201 with others etiologies were also excluded from these studies. Six studies
202 (46.15%) did not mention the exclusion criteria adopted.^{2,9,19,30,32,36}

203 In regards to HCV diagnosis, the most commonly chosen technique was
204 3rd generation anti-HCV ELISA, utilized in five studies (38.46%).^{8,9,36,37,45} Four
205 other studies utilized 2nd generation anti-HCV ELISA (30.7%).^{2,19,29,30} It is
206 noteworthy that in 7 studies, the quantification of the viral titers was performed
207 by HCV RNA PCR.^{6,9,29,36,37,39,40}

208 When the risk factors associated with HCV infection in SM patients were
209 analyzed by the reviewers, only six studies made appropriate epidemiologic and
210 statistical analyses to confirm this correlation.^{19,29,32,36,37,40} The other articles
211 only suggested possible risk factors, without any statistical correlation found.

212 Among selected articles, blood transfusion was cited by seven of them
213 (53.4%) as a risk factor for HCV contamination.^{2,6,29,32,39,40,45} The second most
214 observed risk factor described in three studies was the antischistosomal mass
215 treatment, due to the use of syringes and nosocomial equipments without
216 proper sterilization.^{2,19,29} Surgeries procedures^{19,29}, digestive endoscopy⁴⁵, old
217 age^{9,19}, genetic background⁹ and hemodialysis² were also cited as risk factors
218 for HCV acquisition. However, four studies (30.76%) did not find any
219 association between SM infection and an increased risk to acquire HCV.^{8,30,36,37}

220 All data mentioned are contained in Tables 1, 2 and 3.

221

222

223

224

225 DISCUSSION

226

227 Schistosomiasis is an important public health issue associated with
228 poverty and poor sanitary conditions.¹³ All studies described in literature were
229 conducted in developing countries, since 70' decade, especially in Egypt,
230 Sudan, Ethiopia, Kenya and Brazil, confirming the impact of this disease in
231 them.¹³ The association between schistosomiasis and hepatitis C has been
232 studied by many authors, showing the importance of this condition researches
233 worldwide (Tables 1, 2 and 3).

234 Our analyses show that the majority of articles found on the subject are
235 cross-sectional studies (Table 1) and their aim were to determine the
236 prevalence of HCV infection in a confirmed SM population. Cross-sectional
237 studies are important to identify regions in developing countries that need more
238 attention from the government authorities for implementation public health
239 policies in regards to treatment and control for both hepatitis C and SM.

240 Further, a few studies pointed to a correlation between the association of
241 diseases with morbidity patterns, progression of liver damage^{29,39} and risk
242 factors^{2,6,9,19,29,30,36,37,39,40,45} in acquire HCV, which could be useful to understand
243 the clinical course of this particular condition and for treatment choices (Tables
244 2 and 3). When schistosomiasis and hepatitis C association is established, the
245 clinical course develops into severe hepatocellular damage. Moreover, some
246 authors believe that viral persistence and hepatic cirrhosis can develop faster
247 than in mono-infected people.^{6,29}

248 The high percentage of HCV infection, in schistosomiasis populations of
249 different countries, caught the attention of the scientific community for the

250 variable prevalence of diseases association rates.^{8,19,36,37,40,45} In Egypt, the
251 rates ranged from 10 to 50%^{2,9,19,29,30}, which mainly due the mass treatment of
252 the schistosomiasis infected population in 70' decade, public policy did not
253 adopted in other countries, where the similar prevalence rates cannot be
254 observed.^{8,36,37} However, some authors point to the lack of a relationship
255 between the high prevalence of HCV infection in schistosomiasis endemic
256 areas and the indentification of risk factors associated, although many of them
257 were well defined in literature.^{19,29,32,40}

258 In Brazil, conflicting results among studies on HCV/*S. mansoni*
259 association⁴⁶, performed by various research groups^{**26,40,45}, reinforce the need
260 of further studies about this condition, specially them with appropriated
261 methodologies for prevalence and risk factors evaluations. Actually,
262 methodological issues are the main problem of the majority studies worldwide,
263 demonstrating the inadequacy of study designs.

264 In relation to diagnostic methods to evaluate HCV infections, the
265 serologic method were the most commonly used, including recently developed
266 techniques adapted from the older versions. The 3rd generation ELISA has been
267 performed by many research groups, since it is a fast and relatively cheap
268 technique.^{8,9,36,37,45} Some authors have rejected this method because in *S.*
269 *mansoni* infection could has production of auto-antibodies against HCV
270 epitopes, mimicking HCV infection³. However, this immunoglobulin (Ig)
271 production is not well defined in literature and the auto-Ig's ratios are low, which
272 can be differentiated from HCV infection by increasing the cut-off point. As for
273 schistosomiasis diagnosis, the method of choice continues being Kato-Katz

² **Morais CNL. Avaliação da relação entre marcadores biológicos com os graus de fibrose no complexo hepatite C e esquistossomose. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, CPqAM-FIOCRUZ; 2007

274 test, based on presence of *S. mansoni* eggs in stool samples or in rectal
275 biopsies, and US patterns to evaluate the periportal fibrosis^{43,55} This review
276 confirms that no significant diagnosis methods have been developed for both
277 diseases in last decades.

278 The current systematic review also considered risk factors associated
279 with an increase chance to acquire HCV infection when the subject has
280 SM.^{19,29,32,36,37,40} These data may be useful to direct following and treatment
281 campaigns for both diseases and may contribute to lower prevalence and
282 morbidity rates in the future.

283 The risk factors associated with HCV acquisition most cited by the
284 authors were blood transfusion^{6,32,39,40,45}, in Brazil, and as cited previously, the
285 anti-schistosomiasis parenteral mass therapy^{2,19,29}, in Egypt. Poorly sterilized
286 syringes and equipments used during these campaings^{21,26} may be crucial to
287 increase chances of acquiring HCV.

288 In the HS schistosomiasis form, common in endemic areas, the subject
289 presents esophageal varices in most cases as a consequence of periportal
290 hypertension and disease severity observed in SM.⁴³ Disruption of these veins
291 can cause digestive bleeding and blood transfusion may be required for patient
292 survival^{3**}.

293 Before 1993, the serological screening in Brazilian blood banks did not
294 include anti-HCV markers, in spite of the recent discovery of HCV, thus blood
295 transfusion before this year can be considered as a risk factor for HCV
296 acquisition.¹² In Egypt, the lack of proper sterilization of equipments and reused
297 syringes during anti-schistosomiasis parenteral mass therapy^{21,23} increases the

³ ** Morais CNL. Avaliação da relação entre marcadores biológicos com os graus de fibrose no complexo hepatite C e esquistossomose. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, CPqAM-FIOCRUZ; 2007

298 chance of HCV infection in SM patients. As can be observed, the reasons for
299 acquire HCV infection are very different among the countries and represents a
300 public policies reflex adopted in the most cases.

301 Nonetheless, in most articles the risk factors for HCV infection in a SM
302 population were only suggested by the authors, based on patient reports and
303 epidemiological history, without significant statistical analyses. Thus, more
304 studies are needed to clarify HCV transmission routes and risk factors for
305 HCV/*S. mansoni* association. It is worthy to mention that, through the search
306 methodology conducted here, the last study on this issue was published only in
307 2008, confirming the lack of more researches in this area.

308

309 **CONCLUSION**

310

311 In conclusion, the purpose of this study was to review, through a
312 systematic methodology, scientific articles published about the prevalence of
313 the association between hepatitis C and schistosomiasis in the world.
314 Furthermore, we considered the risk factors for HCV acquisition in SM patients,
315 discussing the most relevant questions and pointing out the aims and
316 conclusions of the selected studies. This revision shows the lack of well-
317 designed studies with appropriate methodology for evaluate prevalence of this
318 condition in schistosomiasis endemic areas, as Brazil or outside that. Despite
319 the limitations, our results may help to identify regions with higher HCV/*S.*
320 *mansoni* association rates. So, new public health policies attempting to reduce
321 the current high prevalence and morbidity rates observed in hepatitis C and
322 schistosomiasis, especially in SM endemic regions, could be proposed.

323 ACKNOWLEDGMENTS

324 We are grateful to the teachers of Endemics Control, a discipline of the Pos-
325 graduation in Public Health of CPqAM/FIOCRUZ-PE, for the important
326 orientation in Systematic Review methods and to the CAPES for conceding the
327 postgraduate scholarship, an important support for the study.

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349 **REFERENCES**

- 350 1- Abbas OM, Omar NA, Zaghla HE, Faramawi MF. *Schistosoma mansoni*
351 coinfection could have a protective effect against mixed cryoglobulinemia
352 in hepatitis C patients. *Liver Int.* 2009; 29:1065-1070.
- 353 2- Abdel-Wahab MF, Zakaria S, Kamel M, Abdel-Khaliq MK, Mabrouk MA,
354 Salama H *et al.* High seroprevalence of hepatitis C infection among risk
355 groups in Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51:563-567.
- 356 3- Agha S, El-Mashad N, El-Malky M, El-Shony H, El-Sherif M, El-Hasan
357 MA *et al.* Prevalence of low positive anti-HCV antibodies in blood donors:
358 *Schistosoma mansoni* co-infection and possible role of auto-antibodies.
359 *Microbiol Immunol.* 2006; 50(6):447-452.
- 360 4- Al-Faleh FZ, Ramia S, Arif M, Ayoola EA, Al-Rashed RS, Al-Jefry M *et al.*
361 Profile of hepatitis C virus and the possible modes of transmission of the
362 virus in the Gizan area of Saudi Arabia: a community based study. *An*
363 *Trop Med Parasitol.* 1995; 89:431-437.
- 364 5- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynsky K, Judson FN, Mares A, Alexander
365 WJ *et al.* The natural history of community acquired hepatitis C in the
366 United States. *N Engl J Med.* 1992; 327:1899-1905.
- 367 6- Aquino RTR, Chieffi PP, Catunda SM, Araújo MF, Ribeiro MCSA,
368 Taddeo EF *et al.* Hepatitis B and C virus markers among patients with
369 hepatosplenic mansonic schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo.*
370 2000; 42(6):313-320.

- 371 7- Bassily S, Hyams KC, El-Marsry NA, Hassan NF, Watts DM. Hepatitis C
372 virus infection and hepatosplenic schistosomiasis. *Scand J Infect Dis.*
373 1992; 24:687-688.
- 374 8- Berthe N, Myrvang B, Gundersen SG. Intensity os *Schistosoma*
375 *mansoni*, hepatitis B, age and sex predict levels of hepatic periportal
376 thickening/fibrosis (PPT/F): A large-scale community-based study in
377 Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(6):1079-1086.
- 378 9- Blanton RE, Salam EA, Kariuki HC, Magak P, Silva L, Michiri EM *et al.*
379 Population-based differences in Schistosomiasis mansoni and hepatitis
380 C induced disease. *J Infect Dis.* 2002; 185:1644-1649.
- 381 10-Boisier P, Ramarokoto CE, Ravoniarimbina P, Rabarijaona L,
382 Ravaoalimalala VE. Geographic differences in hepatosplenic
383 complications of schistosomiasis mansoni and explanatory factors of
384 morbidity. *Trop Med Int Health.* 2001; 6:699-706.
- 385 11-Brandão A, Fuchs SC. Risk factor for hepatitis C virus infection among
386 blood donors in southern Brazil: a case-control study. *BMC*
387 *Gastroenterol.* 2002; 2(18):1-8.
- 388 12-Carrazzone CFV, Brito AM, Gomes YM. Importância da avaliação
389 sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Rev Bras*
390 *Hematol Hemoter.* 2004; 26(2):93-98.
- 391 13-Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of
392 schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 2000; 77:41-51.
- 393 14-Crowther M, Lim W, Crowther MA. Systematic review and meta-analysis
394 methodology. *Blood.* 2010; 116:3140-3146.

- 395 15- Darwish MA, Raouf TA, Rushdy P, Constantine NT, Rao M, Edelman R.
396 Risk factors associated with high seroprevalence of hepatitis C virus
397 infection in Egyptian blood donors. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49:440-
398 447.
- 399 16- Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, Marquet S, Mohamed-Ali Q, Mirghani
400 A et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is
401 controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma
402 receptor gene. *Am J Hum Genet.* 1999; 65:709-721.
- 403 17- El-Gohary A, Hassan A, Nooman Z, Lavanchy D, Mayerat C, El Ayat A *et*
404 *al.* High prevalence of hepatitis C virus among urban and rural population
405 groups in Egypt. *Acta Trop.* 1995; 59:155-161.
- 406 18- El-Khoby T, Galal N, Fenwick A, Barakat R, El-Hawey A, Nooman Z *et*
407 *al.* The epidemiology of schistosomiasis in Egypt: summary findings in
408 nine governorates. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62:88-99.
- 409 19- El-Sayed HF, Abaza SM, Mehanna S, Winch PJ. The prevalence of
410 hepatitis B and C infections among immigrants to a newly reclaimed
411 area endemic for *Schistosoma mansoni* in Sinai, Egypt. *Acta Trop.* 1997;
412 68:229-237.
- 413 20- Farid A, Al-Sherbiny M, Mohamed N, Saad A, Shata MT, Lee DH *et al.*
414 *Schistosoma* infection inhibits cellular immune responses to core HCV
415 peptides. *Parasite Immunol.* 2005; 27:189-196.
- 416 21- Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder
417 LS. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of
418 hepatitis C virus in Egypt. *Lancet.* 2000; 355(9207):887-891.

- 419 22- Green S. Systematic reviews and meta-analysis. *Singapore Med J.* 2005;
420 46(6):270-274.
- 421 23- Habib M, Mostafa K, Abdel-Aziz F, Magder LS, Abdel-Hamid M, Gamil F
422 *et al.* Hepatitis C virus infection in a community in the Nile delta: risk
423 factors for seropositivity. *Hepatol.* 2001; 33:248-253.
- 424 24- Halim AB, Garry RF, Dash S, Gerber M. Effect of schistosomiasis and
425 hepatitis on liver disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(6):915-920.
- 426 25- Hassan MM, Zaghloul AS, El-Serag HB, Soliman O, Patt YZ, Chappell
427 CL *et al.* The role of hepatitis C in hepatocellular carcinoma: a case
428 control study among Egyptians patients. *J Clin Gastroenterol.* 2001;
429 33(2):123-126.
- 430 26- Heintges T, Wands J. Hepatitis C virus: Epidemiology and transmission.
431 *Hepatology.* 1997; 26:521-526.
- 432 27- Homeida M, Ahmed S, Dafalla A, Suliman S, Elton I, Nash T *et al.*
433 Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection as determined
434 by ultrasound: a study in Geriza, Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;
435 39:196-201.
- 436 28- Jordan P, Webbe G, Sturrock RF, eds. Human schistosomiasis.
437 Wallingford: CAB International; 1993.
- 438 29- Kamal S, Madwar M, Bianchi L, Tawil AEL, Fawzy R, Peters T *et al.*
439 Clinical, virological and histopathological features: long-term follow-up in
440 patients with chronic hepatitis C co-infected with *S. mansoni*. *Liver Int.*
441 2000; 20:281-289.

- 442 30-Kamel MA, Miller FD, Masry AG, Zakaria S, Khattab M, Essmat G *et al.*
443 The epidemiology of *Schistosoma mansoni*, hepatitis B and hepatitis C
444 infection in Egypt. *An Trop Med Parasitol.* 1994; 88(5):501-509.
- 445 31-King CH, Magak P, Abdel-Salam E, Ouma JH, Kariuki HC, Blanton E.
446 Measuring morbidity in schistosomiasis mansoni: relationship between
447 image pattern, portal vein diameter and portal branch thickness in large-
448 scale surveys using new WHO coding guidelines for ultrasound in
449 schistosomiasis. *Trop Med Int Health.* 2003; 8:109-117.
- 450 32-Lacerda CM, Ramos H, Melo IS, Machado IS. Prevalência do anti-HCV e
451 de marcadores do vírus B na esquistossomose hepatoesplênica. *An Fac*
452 *Med.* 1993; 38(1):30-32.
- 453 33-Mohamed A, Elsheikh A, Ghandour Z, Al Karawi M. Impact of hepatitis C
454 virus infection on schistosomal liver disease. *Hepatogastroenterology.*
455 1998; 45:1492-1496.
- 456 34-Mohamed MK, Bakr I, El-Hoseiny M, Arafa N, Hassan A, Ismail S *et al.*
457 HCV-related morbidity in a rural community of Egypt. *J Med Virol.* 2006;
458 78:1185-1189.
- 459 35-Mohamed-Ali Q, Elwali NE, Abdelhameed AA, Mergani A, Rahoud S,
460 Elagib KE *et al.* Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human
461 *Schistosoma mansoni* infections: evidence that intensity and duration of
462 infection, gender and inherited factors are critical in disease progression.
463 *J Infect Dis.* 1999; 180:1298-1306.
- 464 36-Mudawi HMY, Smith HM, Fletcher IA, Fedail SS. Prevalence and
465 common genotypes of HCV infection in Sudanese patients with
466 hepatosplenic schistosomiasis. *J Med Virol.* 2007; 79:1322-1324.

- 467 37-Mudawi HMY, Smith HM, Rahoud SA, Fletcher IA, Babikir AM, Saeed
468 OK *et al.* Epidemiology of HCV infection in Geriza State of Central
469 Sudan. *J Med Virol.* 2007; 79:383-385.
- 470 38-Palmeira DCC, Carvalho AG, Rodrigues K, Couto, JLA. Prevalência da
471 infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de
472 Alagoas. *Rev Soc Bras de Med Trop.* 2010; 43(3):313-317.
- 473 39-Pereira LM, Saleh MG, Koskinas J, Williams R, MacFarlane I, Melo MC
474 *et al.* Hepatitis C virus infection in schistosomiasis mansoni in Brazil. *J*
475 *Med Virol.* 1995, 45:423-428.
- 476 40-Pereira LMMB, Spinelli V, Lacerda C, Mies S, Massarolo PCB,
477 McFarlane IG. Hepatite B e C na esquistossomose mansoni. *GED.* 2001;
478 20(3):71-77.
- 479 41-Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis
480 progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet.* 1997; 349:825-
481 832.
- 482 42-Raia S, Silva LC, Gayotto LCC, Forster SC, Fukushima J, Strauss E.
483 Portal hypertension in schistosomiasis a long-term follow-up of a
484 randomized trial comparing three types of surgery. *Hepatol.* 1994;
485 20:398-403.
- 486 43-Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas
487 Américas e na África. 3rd Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- 488 44-Richter J, Monteiro E, Braz RM, Abdalla M, Abdel-Rahim IM, Fano U *et*
489 *al.* Sonographic organometry in Brazilian and Sudanese patients with
490 hepatosplenic schistosomiasis mansoni and its relation to the risk of
491 bleeding from oesophageal varices. *Acta Trop.* 1992; 51:281-290.

- 492 45- Silva JLA, Coelho MRCD, Souza VSB, Domingues ALC.
493 Soroprevalência da hepatite C em pacientes com esquistossomose. *Rev*
494 *Para Med.* 2008; 22(1):27-32.
- 495 46- Soares EC, Kobayashi J, Nishimura N, Yamanaka A, Dacal A.
496 Associação entre esquistossomose e vírus B e C da hepatite em um
497 núcleo populacional. *Soc Bras Hepatol.* 1993; 12: 75.
- 498 47- Strickland GT, Elhefni H, Salman T, Waked I, Abdel-Hamid M, Mikhail N
499 *et al.* Role of hepatitis C infection in chronic liver disease in Egypt. *Am J*
500 *Trop Med Hyg.* 2002; 67:436-442.
- 501 48- Strickland GT. Gastrointestinal manifestations of schistosomiasis. *Gut.*
502 1994; 35:1334-1337.
- 503 49- Tavares-Neto J, Prata A, Paraná R, Valente VB, Vitvitski L, Figueiredo
504 FC. Very low prevalence of hepatitis C virus infection in rural
505 communities of northeastern Brazil with a high prevalence of
506 schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(4):290-293.
- 507 50- Tavares-Neto J. Marcadores sorológicos das hepatitis B e C em
508 residents de área endêmica da esquistossomose mansônica (thesis
509 resume). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(4):411-413.
- 510 51- Thanaa EA, Helal MD, Moheb F, Danial MD, Hassan FA. The
511 relationship between hepatitis C virus and Schistosomiasis:
512 histopathologic evaluation of liver biopsy specimens. *Human pathol.*
513 1998; 29(7):743-749.
- 514 52- Thomas S, Elhefni H, Salman T, Waked I, Abdel-Hamid M, Mikhail NN *et*
515 *al.* Role of hepatitis C infection in chronic liver disease in Egypt. *Am J*
516 *Trop Med Hyg.* 2002; 67:436-442.

- 517 53-Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.*
518 2005; 11:86-94.
- 519 54-Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after
520 transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med.* 1995; 332:1463-1466.
- 521 55-World Health Organization (WHO). Ultrasound in schistosomiasis. A
522 practical guide to the standardized use of ultrasonography for the
523 assessment of schistosomiasis-related morbidity. Niamey, Niger: Second
524 International Workshop. 1996; 22-26.
- 525 56-World Health Organization. Prevention and Control of Schistosomiasis
526 and Soil-Transmitted Helminthiasis. Geneva: World Health Organization.
527 2002.

Figure 1: Flowchart of the systematic review results. The database utilized for articles search was www.bireme.br and fulfills the minimum criteria to perform a systematic review.

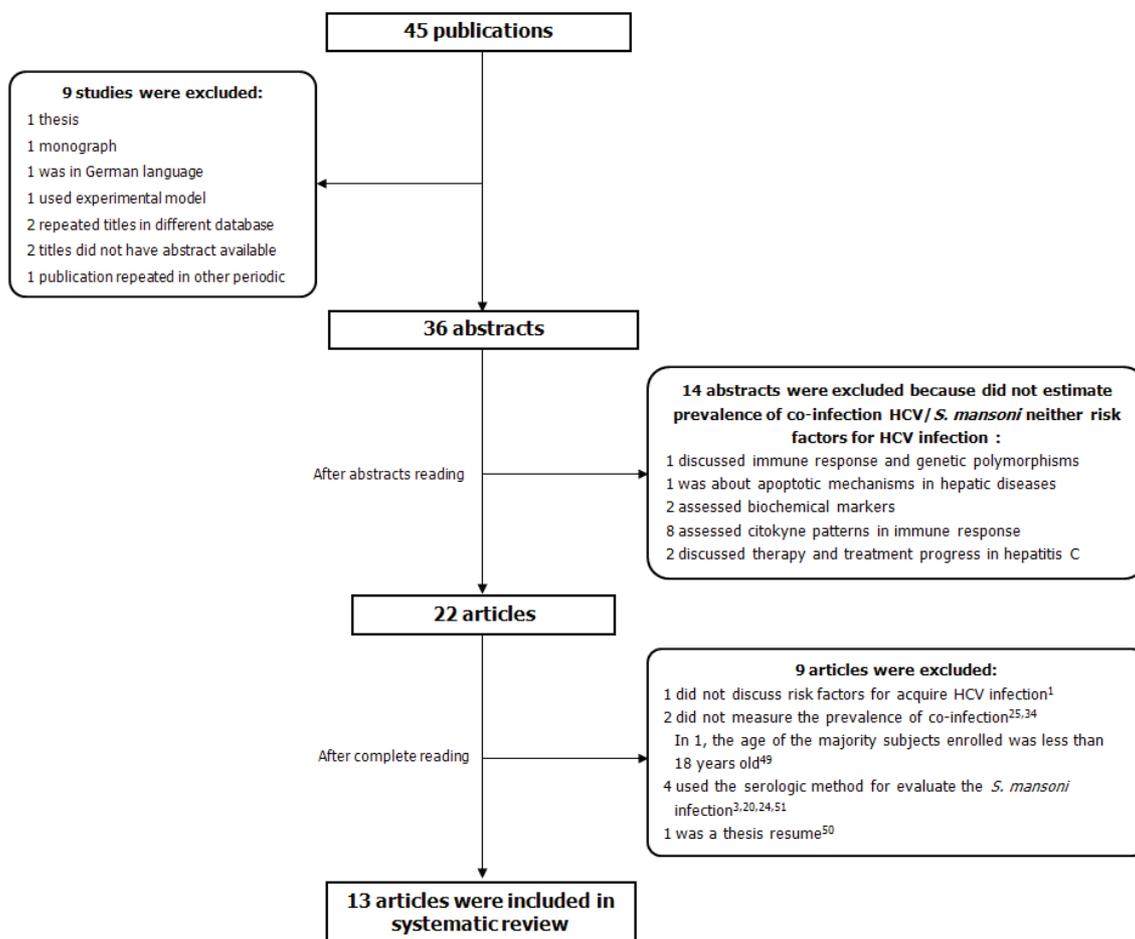


Table 1: Systematic review results – Authors, epidemiological data and objective of studies selected

Author	Country	Type of study	Objective
Silva, J. L. A. <i>et al</i> ⁴⁵ (2008)	Brazil	Cross-sectional	To obtain the serological prevalence for HCV in SM patients
Mudawi, H. M. <i>et al</i> ^{36*} (2007)	Sudan	Cross-sectional	To determine the prevalence of HCV and identify the most common genotype in patients with HSS
Mudawi, H. M. <i>et al</i> ^{37*} (2007)	Sudan	Population based Cross-sectional	To determine the HCV prevalence and the risk factors associated, in a population living in SM endemic area
Berthe, N. <i>et al</i> ⁸ (2007)	Ethiopia	Population based Cross-sectional	To elucidate determinants of morbidity in SM
Blanton, R. E. <i>et al</i> ⁶ (2002)	Egypt and Kenya	Population based Cross-sectional	To compare the severity of hepatic lesions and morbidity in co-infection in two populations with different epidemiological patterns for SM and hepatitis C
Pereira, L. M. M. B. <i>et al</i> ^{40*} (2001)	Brazil	Cross-Sectional with an external control group	To analyze the frequency of HBV and HCV markers and to do the correlation with severity of hepatic lesions in co-infected patients
Kamal, S. <i>et al</i> ^{39*} (2000)	Egypt	Cross-sectional	To investigate the influence of SM on chronic hepatitis C with respect to the natural course of the disease and others parameters
Aquino, R. T. R. <i>et al</i> ⁶ (2000)	Brazil	Retrospective cases series	To evaluate the frequency and the consequences of the co-infection of hepatitis B and C in patients with HSS
El-Sayed, H. F. <i>et al</i> ^{39*} (1997)	Egypt	Cross-sectional	To determine the prevalence of HBV and HCV in a endemic area for SM and the risk factors associated with co-infection
Pereira, L. M. <i>et al</i> ³⁹ (1995)	Brazil	Cross-sectional with an external control group	To investigate the HCV participation in severity of hepatic lesions in SM patients
Abdel-Wahab, M. F. <i>et al</i> ² (1994)	Egypt	Prospective cases series	To estimate the prevalence and magnitude of HCV infection in Egypt