



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



**Clarice Neuenschwander Lins de Moraes**

---

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES  
BIOLÓGICOS COM OS GRAUS DE FIBROSE  
HEPÁTICA E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NO  
COMPLEXO HEPATITE C E  
ESQUISTOSSOMOSE**

---

RECIFE  
2007

**Clarice Neuenschwander Lins de Moraes**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES BIOLÓGICOS COM OS GRAUS DE  
FIBROSE HEPÁTICA E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NO COMPLEXO HEPATITE  
C E ESQUISTOSSOMOSE.**

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

Área Temática: Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos.

**Orientadores: Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro  
Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*)**

**Recife  
2007**

**Clarice Neuenschwander Lins de Moraes**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES BIOLÓGICOS COM OS GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NO COMPLEXO HEPATITE C E ESQUISTOSSOMOSE.**

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

Área Temática: Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

---

**Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues**  
Hospital das Clínicas/ UFPE

---

**Dr. Edmundo Pessoa Lopes Neto**  
Hospital das Clínicas/UFPE

---

**Dra. Eridan Medeiros Coutinho**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

---

**Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Ao meu orientador, Frederico G. C. Abath (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Silvia Montenegro, pelo apoio, dedicação, confiança, amizade e carinho indispensáveis ao meu crescimento pessoal e profissional durante todos esses anos de convivência.

Ao Dr. Frederico Abath (*in memoriam*) por seu apoio, dedicação, amizade, seriedade, profissionalismo e por sempre me incentivar a confiar e acreditar no meu potencial.

A Dra. Ana Lúcia Domingues, ao Dr. Edmundo Lopes e aos médicos que faziam parte da residência da Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco: Basílio, Cíntia, Simone, Rodrigo, Isabella, Júlia e Rafaela pela dedicação, amizade e ensinamentos indispensáveis ao meu crescimento profissional, sem falar na imensa ajuda na seleção dos pacientes, realização de biópsias hepáticas, ultra-sonografia.

A Dra. Valéria Pereira pela amizade, apoio, incentivo e colaboração em todos os momentos.

Aos pacientes e membros do grupo controle sem o quais esse estudo não teria sido realizado.

À coordenação do curso de pós-graduação em Saúde Pública do CPqAM, em especial ao Dr. Eduardo Freese, pela disponibilidade, apoio e dedicação durante todo período do Doutorado.

A todos que fizeram e fazem parte da secretaria acadêmica do Doutorado, em especial a Fabiana, Nilda e Joselice.

A todos os amigos que fazem parte do Departamento de Imunologia do CPqAM.

Aos amigos do SEINFO, da Biblioteca e da estatística, em especial a George Diniz.

A todos os meus amigos do curso de Doutorado, em especial a Fábio, pela dedicação, amizade e por disponibilizar seu tempo para me ajudar na realização dos experimentos de biologia molecular do meu projeto de tese.

Aos meus amigos, Joelma, Sheilla, Eduardo, Bruno, Lilian, Kika, Cris, Juliana e Daniel.

A toda minha família por todo incentivo e apoio, meus pais, meu irmão, meu padrasto Marcelo e em especial aos meus Tios Barcelos e Cida e meus primos Maria Regina e Thiago por me acolherem como filha e irmã e com amor e atenção indispensáveis a minha vida.

Ao meu companheiro Romero por todo amor, cuidado, incentivo e admiração durante esses 3 últimos anos de convivência e principalmente pela imensa felicidade que ele me deu de formarmos uma nova e maior família com nosso bebê Henrique.

Defendo esse Doutorado e chego até aqui com algumas perdas e ganhos ao longo do caminho percorrido, mas com a felicidade de estar finalizando mais uma etapa da minha vida e além disso, estar realizando outros grandes sonhos, o de ganhar duas famílias, a minha família com marido e filho e também após muito esforço e estudo, a família Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

## RESUMO

A fibrose é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada a hepatite C e esquistossomose. A biópsia hepática é considerada o padrão-ouro para acessar o estágio da fibrose; no entanto, é um procedimento invasivo e tem potencial para complicações. Com isso, vários estudos surgiram na tentativa de desenvolver métodos não invasivos para avaliar o grau da fibrose hepática. O grau das lesões necro-inflamatórias, estágio da fibrose e a possível relação sinérgica na co-infecção hepatite C e esquistossomose para uma progressão à doença hepática severa não foi completamente elucidada. O objetivo principal desse projeto foi avaliar marcadores biológicos com potencial para previsão de severidade/gravidade de fibrose hepática na esquistossomose, hepatite C e na co-infecção. Foram selecionados: pacientes com hepatite C (n=37), hepatite C/ esquistossomose hepatoesplênica (n=19), e com esquistossomose hepatoesplênica, (EHE, n=23) e grupo controle (n=13). Biópsias hepáticas, ultrassonografia, parasitológicos de fezes, testes bioquímicos de bilirrubinas, alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), eletroforese de proteínas, gama- glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina (FA) e ácido hialurônico foram realizados em todos os pacientes. Também foram realizadas pesquisa de anticorpos para hepatite B, anti-HIV, anti-HCV e confirmação da hepatite C através da detecção do RNA viral e genotipagem. As citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 foram dosadas no plasma e as citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$  foram detectadas nas biópsias hepáticas através da técnica de RT-PCR em Tempo Real. A análise estatística foi realizada através de ANOVA e curvas ROC, considerando  $p < 0,05$  como significativo. Não se observou diferenças estatísticas nos níveis séricos das citocinas TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 entre os 4 grupos estudados. Em relação aos graus de fibrose demonstrou-se que a citocina TNF- $\alpha$  ( $p = 0,010$ ), ácido hialurônico ( $p = 0,036$ ) e FA ( $p = 0,004$ ) diferenciaram os pacientes com hepatite C entre fibrose leve e severa. Nesses pacientes, os níveis de ALT ( $p = 0,013$ ), AST ( $p = 0,030$ ) e FA ( $p = 0,021$ ) diferenciaram em atividade inflamatória leve e severa. Nos pacientes com EHE, demonstramos que a  $\gamma$ GT ( $p = 0,034$ ) e relação AST/ plaquetas diferenciou fibrose grau II e III. Analisando sensibilidade e especificidade, concluiu-se que os possíveis

marcadores biológicos para diagnosticar fibrose e atividade inflamatória hepática em pacientes com hepatite C foram TNF- $\alpha$ , ácido hialurônico, FA, ALT e AST.

**Palavras-Chave:** Hepatite C, esquistossomose, marcadores biológicos, fibrose hepática, citocinas.

## ABSTRACT

Fibrosis is the major cause of mortality and morbidity related to schistosomiasis and hepatitis C. In both diseases fibrosis is the major pathogenic factor, although produced by different immunological mechanisms. Hepatic biopsy is the gold-standard method to stage fibrosis, however, it is an invasive procedure and is potentially dangerous. Thus, several studies have emerged in an attempt to develop non invasive methods to evaluate the stage of hepatic fibrosis. The possible synergistic association between schistosomes and hepatitis C that may lead to severe hepatic disease remains unclear. The main objective of this study was to evaluate biological markers as bilirubins, transaminases ALT and AST, total proteins,  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT), alkaline phosphatase (FA) and hyaluronic acid, that can be used to predict severity of hepatic fibrosis in schistosomiasis and hepatitis C as isolated diseases or in co-infections. The following groups were selected for the study: hepatitis C patients (n=37); hepatitis C/ hepatosplenic schistosomiasis patients (n=19), hepatosplenic schistosomiasis patients (n=23) and a control group (n=13). Hepatic biopsies, ultrasonography, stool exams, and blood tests for biochemical markers of fibrosis were performed. All patients were tested for hepatitis B, HIV and antibodies against hepatitis C. Diagnosis of hepatitis C patients was confirmed by detection of viral RNA and genotyping. The serum levels of cytokines IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were detected by ELISA and the RNA of the cytokines IL-13 and IFN- $\gamma$  were evaluated by quantitative real-time RT-PCR in hepatic biopsies. The ANOVA and ROC tests were used for statistical analysis. p values of 0,05 were considered significant. Serum levels of TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-13 were not significantly different between the study groups. Respecting hepatitis C patients we showed that TNF- $\alpha$  (p= 0,010), hyaluronic acid (p= 0,036) and FA (p= 0,004) could differentiate severe and mild hepatic fibrosis. Besides, regarding inflammatory activity, ALT (p = 0,013), AST (p = 0,030) and FA (p = 0,021) were the best markers to differentiate mild and severe activity. In hepatosplenic patients, we found that  $\gamma$ GT (p= 0,034) and AST/ platelets (p = 0,034) were capable to differentiate between grade II and III of fibrosis. In conclusion, the possible biological markers to evaluate

fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C patients were: TNF- $\alpha$ , hialuronic acid, FA, ALT e AST.

**Keywords:** Hepatitis C, schistosomiasis, biological markers, hepatic fibrosis, cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico do vírus da hepatite C.	21
Figura 2. Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .	29
Figura 3. Níveis séricos das citocinas IL-13, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ em pg/ml em pacientes com hepatite C, hepatite C/ EHE, EHE e grupo controle.	58
Figura 4. Níveis séricos de ácido hialurônico (ng/ml) em pacientes com hepatite C, hepatite C/ EHE, EHE e grupo controle.	59
Figura 5. Níveis séricos de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ GT) em U/L em pacientes com hepatite C, hepatite C/ EHE, EHE e grupo controle.	60
Figura 6. Níveis séricos de bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI) em mg/dl em pacientes com hepatite C, hepatite C/ EHE, EHE e grupo controle.	61
Figura 7. Níveis séricos de albumina e gamaglobulina em g/dl em pacientes com hepatite C, hepatite C/ EHE, EHE e grupo controle.	62
Figura 8. Níveis séricos de fosfatase alcalina (U/L) e albumina (g/dL) em com hepatite C/EHE.	68
Figura 9. Níveis séricos de gama glutamil transferase (GGT) em U/L em pacientes com EHE.	69
Figura 10. Relação AST/ALT e graus de fibrose através de USG utilizando a classificação do Cairo em pacientes com EHE.	69

## TABELAS

	Página
Tabela 1: Características demográficas dos indivíduos estudados	55
Tabela 2: Número de pacientes classificados de acordo com o exame histológico (classificação METAVIR) e ultra-sonografia (classificação do Cairo)	56
Tabela 3. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de fibrose em pacientes com hepatite C	63
	64
Tabela 4. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C	
	65
Tabela 5. Relação entre idade e sexo com graus de fibrose e atividade inflamatória nos pacientes com hepatite C.	
Tabela 6. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/EHE	66
Tabela 7. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/EHE	67
Tabela 8 – Níveis séricos de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C em relação aos graus de fibrose leve (F0, F1) ou severa (F2, F3, F4)	70
Tabela 9 – Níveis séricos de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C em relação aos graus de atividade inflamatória leve (A0, A1) e severa (A2, A3).	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\gamma$ GT	$\gamma$ -Glutamil- transferase
A0	Sem atividade histológica
A1	Atividade histológica leve
A2	Atividade histológica moderada
A3	Atividade histológica severa
ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato amino transferase
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BT	Bilirrubina Total
CD	“Cluster of differentiation”
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECMP	“Extra Celular Matrix Proteins”
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
F0	Sem fibrose
F1	Fibrose portal sem septos
F2	Fibrose portal com poucos septos
F3	Fibrose portal com numerosos septos sem cirrose
F4	Cirrose
FA	Fosfatase alcalina
G1	Fibrose periportal leve
GII	Fibrose periportal moderada
GIII	Fibrose periportal severa
HCV	“Hepatitis C vírus”
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
IL-13	Interleucina-13
mRNA	RNA mensageiro

RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	“Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction”
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento- $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
WHO	“World Health Organization”

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
<b>2.1 Hepatite C</b>	19
2.1.1 Epidemiologia e transmissão	19
2.1.2 A doença	21
2.1.3 Imunopatologia	23
2.1.4 Diagnóstico	26
<b>2.2 Esquistossomose mansônica</b>	28
2.2.1 Epidemiologia e transmissão	28
2.2.2 A doença	30
2.2.3 Imunopatologia	33
2.2.4 Diagnóstico	35
<b>2.3 Co-infecção Hepatite C e esquistossomose</b>	38
2.3.1 Epidemiologia e resposta imune	37
2.3.2 Biópsia hepática e marcadores biológicos	40
2.3.3 Fibrose hepática	42
2.3.4 Justificativa	44
2.3.5 Pergunta condutora	45
2.3.6 Hipótese do estudo	45
<b>3 OBJETIVOS</b>	46
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	46
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	46

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Seleção de pacientes, exame clínico e laboratorial</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Avaliação do grau de fibrose e da atividade inflamatória</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Avaliação dos níveis de marcadores bioquímicos</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Avaliação dos níveis de citocinas</b>	<b>50</b>
<b>4.5 Análise estatística e desenho do estudo</b>	<b>53</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Relação entre níveis de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C, hepatite C/EHE, EHE e grupo controle.</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose e atividade inflamatória em pacientes com hepatite C</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose e atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/ EHE</b>	<b>65</b>
<b>5.4 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose e pacientes com EHE</b>	<b>68</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICES</b>	

## **ANEXOS**

## 1 INTRODUÇÃO

Com cerca de 170 milhões de pessoas infectadas no mundo, a hepatite C compete com a doença hepática alcoólica como a maior causa de doença crônica do fígado (World Health Organization, 2000). Um processo inflamatório contínuo e ineficiente para a eliminação do vírus pelo sistema imunológico é o principal responsável pela fibrogênese, podendo evoluir para cirrose hepática e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001).

A esquistossomose, assim como a hepatite C, é uma doença hepática crônica que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo. A patologia resultante da infecção com o helminto *Schistosoma mansoni* é causada por uma reação granulomatosa do hospedeiro contra os ovos do parasita que se localizam principalmente no fígado. Este processo pode levar a fibrose hepática severa causando hipertensão porta, e eventualmente a óbito por sangramento digestivo alto, o que pode ser observado em pacientes que desenvolvem a forma grave da doença, a hepatoesplênica (ABATH et al., 2006).

Andrade (1962) e Dusek et al. (1965) salientaram que a hepatite crônica associada a esquistossomose agrava a doença hepática causada pelo *S. mansoni*. As razões para o alto índice dessa associação seriam as transfusões de sangue devido às hemorragias digestivas secundárias às varizes esofagianas causada pela hipertensão portal esquistossomótica. Segundo Kamal et al. (2001), pacientes coinfetados com vírus da hepatite C e esquistossomose exibem um padrão clínico, virológico e histológico peculiar manifestado por persistência viral com altos títulos de RNA, assim como elevada necrose, inflamação e fibrose. Entretanto, Gad et al. (2001) observaram níveis significativamente mais baixos de carga viral em pacientes co-infetados em relação aos infectados apenas com vírus C.

Tanto a esquistossomose como a hepatite C desenvolvem fibrose por mecanismos imunológicos diferentes. A fibrose é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada a essas patologias. A biópsia hepática é considerada o padrão-ouro para acessar o estágio da fibrose, no entanto, é um procedimento invasivo e tem potencial para complicações. Com isso, vários estudos surgiram na tentativa de desenvolver métodos não invasivos para avaliar o grau da fibrose

hepática (BISMUT et al., 2001; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; FREEMAN et al., 2003; MYERS et al., 2003, POYNARD et al., 2004; POYNARD et al., 2005).

Na literatura, a maioria dos trabalhos relacionados a estes estudos são direcionados a hepatite C e outros relacionam marcadores de fibrose na esquistossomose. O presente projeto, entretanto, estudou marcadores biológicos para fibrose também na associação das duas patologias para avaliar o grau das lesões necro-inflamatórias, estágio da fibrose e a possível relação sinérgica na co-infecção hepatite C e esquistossomose que levariam a uma piora da lesão hepática.

O objetivo principal desse projeto foi avaliar marcadores biológicos que pudessem ser utilizados para previsão de severidade/gravidade de fibrose hepática na esquistossomose, hepatite C e na co-infecção. Os seguintes grupos foram selecionados: pacientes com hepatite C (n=37), hepatite C e esquistossomose hepatoesplênica (n=19), com esquistossomose hepatoesplênica (n=23) e grupo controle (n= 13).

Para isso, foram realizadas biópsias hepáticas, ultrassonografia, parasitológicos de fezes, testes bioquímicos de bilirrubinas, transaminases, eletroforese de proteínas, gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina e ácido hialurônico dos pacientes pertencentes aos grupos selecionados. Além disso, foram realizadas também pesquisa de anticorpos para hepatite B, anti-HIV, anti-HCV e confirmação da hepatite C através da detecção do RNA viral e genotipagem.

As citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 foram dosadas no plasma e as citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$  foram detectadas nas biópsias hepáticas através da técnica de RT-PCR em Tempo Real pela quantificação relativa do RNAm codificando essas citocinas.

Esse trabalho poderá contribuir para um maior entendimento dos mecanismos imunológicos, processos fibrogênicos e marcadores bioquímicos preditores de grau de fibrose envolvendo essas patologias.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Hepatite C**

#### **2.1.1 Epidemiologia e transmissão**

A evolução da infecção pelo vírus C é silenciosa na maioria dos indivíduos, se caracteriza por alta persistência viral e cerca de 85% dos indivíduos infectados evoluem para a forma crônica. O potencial evolutivo para cirrose e hepatocarcinoma fazem, portanto, com que a hepatite C se constitua um grave problema de Saúde Pública (IMBERT- BISMUT et al., 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 3% da população mundial, o que corresponde a cerca de 170 milhões de pessoas, estejam infectadas com vírus da hepatite C (HCV) e sob risco de desenvolverem cirrose e hepatocarcinoma. Além disso, mundialmente, cerca de 3 a 4 milhões de novas pessoas são infectadas por ano (World Health Organization, 2000).

O HCV é o agente causal de mais de 90% das hepatites pós-tranfusionais pois é transmitido principalmente através de contato com sangue e seus derivados, sendo a transfusão de sangue e uso de agulhas e/ou seringas contaminadas as principais causas de sua disseminação (POYNARD et al., 2003). Porém, com a introdução de testes sorológicos na triagem de doadores de sangue/órgãos, a partir de 1991 na maioria dos países e a partir de 1993 no Brasil, a transmissão pós-transfusional e pós-transplante da hepatite C quase desapareceu e o uso de drogas intravenosas passou a ser o principal fator de risco. Outras formas de contaminação parenteral seriam o uso de equipamentos não esterilizados em procedimentos médicos, odontológicos, de tatuagem, de piercing, de acupuntura, exposição ocupacional em profissionais de saúde. Mais raramente como forma não parenteral de transmissão da doença, há a possibilidade de transmissão sexual. A transmissão materno-fetal pode ocorrer em alguns casos, mas é rara (STRAUSS, 2001).

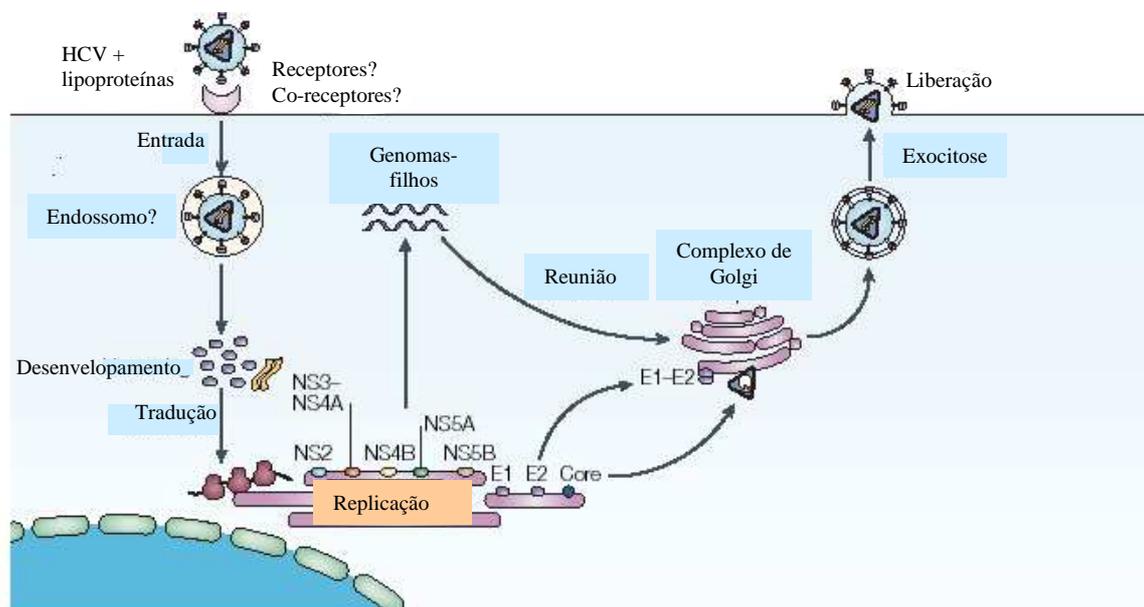
O HCV foi descoberto por Choo et al. (1989), e é um vírus RNA de fita simples com polaridade positiva, pertencente a família *Flaviviridae*, com genoma de aproximadamente 9600 nucleotídeos (GAD et al., 2001). O HCV se replica preferencialmente no citoplasma de hepatócitos, mas diferentes seqüências têm sido isoladas em células dendríticas e foi demonstrada replicação viral em células B (BAIN et al., 2001; SUNG et al., 2003).

Diferentemente do vírus da hepatite B, o genoma do HCV não entra no núcleo das células infectadas; ao contrário, o seu RNA funciona diretamente como RNA mensageiro (RNAm) no citoplasma da célula hospedeira onde a tradução é iniciada, codificando uma poliproteína que é pós-traduzida em 10 proteínas: estruturais (core, envelope E1 e E2), p7 e não estruturais (NS-2, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A e NS-5B). Existem cerca de 6 genótipos principais do vírus C com mais de 100 subtipos e dentro de cada indivíduo coexistem ainda seqüências do HCV apresentando variações distintas, mas intimamente relacionadas, as chamadas *quasispecies*, que ocorrem devido a replicação imperfeita do vírus, com falha de atividade de correção da RNA polimerase viral (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

Devido a alta taxa de replicação viral ( $\sim 10^{12}$  virions por dia) e capacidade mutagênica do HCV, a seqüência e imunogenicidade da maior parte da população viral muda rapidamente. Isso deve estar provavelmente relacionado ao escape à resposta imune humoral e celular específica do hospedeiro, levando ao alto percentual de indivíduos que desenvolvem a infecção crônica (FARCI et al., 2000).

No soro, o HCV se associa com a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, através da ligação de proteínas do envelope E1 e E2, o vírus se liga ao receptor de LDL e/ou outros co-receptores ou receptores como o CD81 e penetra na célula hospedeira através de endossomos, assim liberando seu genoma no citoplasma (AGNELLO et al., 1999).

As proteínas virais traduzidas, o molde de RNA e fatores da célula hospedeira formam uma rede membranosa perinuclear onde inicialmente uma fita molde negativa de RNA é produzida e usada para gerar várias fitas de RNA positivas. As proteínas do capsídeo e as moléculas de RNA se unem para formar um nucleocapsídeo que adquire um envelope e é liberado como um virion maduro pela célula hospedeira e assim infectar outras células (LINDENBACH; RICE, 2001).



**Figura 1. Ciclo biológico do vírus da hepatite C.**  
**Fonte: Rehmann e Nascimbeni (2005)**

### 2.1.2 A doença

#### a) Infecção aguda

O período de incubação até o aparecimento dos sintomas clínicos varia de 15 a 150 dias, sendo a fadiga e a icterícia os sintomas mais comuns (World Health Organization, 2000). Entretanto, a maioria dos indivíduos contaminados com HCV (cerca de 70% dos casos), desenvolvem formas anictéricas da hepatite, evoluindo para a infecção crônica assintomáticos, sem terem conhecimento da presença de anticorpos anti-HCV e/ou do aumento das enzimas hepáticas como a alanina amino transferase- ALT (STRAUSS, 2001).

Após a contaminação, o melhor marcador é a detecção do RNA viral, já que os anticorpos surgem apenas entre 4 a 20 semanas após o contágio. Nessa fase de janela imunológica pode ocorrer transmissão via transfusão sanguínea e através do uso de drogas intravenosas (STRAUSS, 2001). Apenas um pequeno número de indivíduos (15%) consegue controlar a infecção aguda espontaneamente, sugerindo

que a resposta imune ao HCV na maioria das vezes é fraca (FUNG; LOK, 2005). Pacientes com respostas fracas na fase aguda são freqüentemente assintomáticos (sem icterícia) e são mais propensos a se tornarem portadores crônicos (POYNARD et al, 2003).

### *b) Infecção crônica*

Após a infecção aguda, a viremia persiste e cerca de 85% dos indivíduos desenvolvem infecção crônica (COSTA et al., 2002).

A hepatite C crônica é uma doença caracterizada por lesão hepática, inflamação e fibrose. A progressão da fibrose é extremamente variável e a história natural da doença pode se estender por várias décadas. Entretanto, fatores virais e do hospedeiro, assim como presença de outras infecções podem acelerar a progressão da fibrose hepática (KAMAL et al., 2006).

Aproximadamente 20% dos pacientes desenvolverão cirrose num período variável de 20 a 30 anos e estão sob risco de desenvolverem complicações secundárias a hipertensão portal e/ou insuficiência hepática como hemorragia de varizes esôfagogástricas e hepatocarcinoma (1 a 5%). Entre os sintomas mais freqüentes estão os relacionados a manifestações extra-hepáticas da doença: fadiga, sintomas reumáticos (artralgia, e mialgia) e sintomas cutâneo-mucosos (prurido, síndrome sicca). A crioglobulinemia está presente em cerca de 40% dos pacientes com hepatite C e a vasculite sistêmica, complicação severa da crioglobulinemia, apesar de rara (1%), é a doença inflamatória sistêmica mais freqüente. Os sinais de doença hepática ocorrem normalmente na fase de cirrose descompensada (POYNARD et al., 2003).

### 2.1.3 Imunopatologia

Muito do que se sabe sobre a resposta imune inicial durante a infecção pelo vírus C, foi obtido através de estudos experimentais com chimpanzés, o único modelo animal usado para estudar o curso natural da infecção pelo vírus C (BIGGER; BRASKY; LANFORD, 2001; SU et al., 2002).

Poucos dias após a infecção, semanas antes do pico de alanina aminotransferase (ALT), ocorrem aumento de células T específicas para o HCV e mudanças na expressão intrahepática de vários genes incluindo aqueles envolvidos na transcrição de interferons tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), proteína quinase dependente de RNA dupla fita (PKR) e genes que codificam citocinas quimiotáticas para leucócitos e estimulam a proliferação e citotoxicidade de células *natural killer* (NK) no local da infecção (BIGGER; BRASKY; LANFORD, 2001).

Células T específicas ativadas entram no fígado através da veia porta e artéria hepática entrando em contato com células apresentadoras de antígenos como células endoteliais sinusoidais e células de Kupffer. A imunidade inata ativa células NK a secretarem IFN- $\gamma$  e a aumentar a expressão de quimiocinas e migração de linfócitos para o parênquima hepático. Células T citotóxicas e auxiliares desempenham suas funções após reconhecimento do complexo MHC-peptídeos virais nas células infectadas. Alguns estudos experimentais com chimpanzés demonstraram que o aparecimento de células T CD8<sup>+</sup> coincide com diminuição da carga viral (COOPER et al., 1999; THIMME et al., 2002). Além disso, respostas imunes vigorosas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas em pacientes com hepatite C aguda estão associadas com a recuperação, sendo a ausência dessas respostas relacionadas à persistência da infecção e evolução para cronicidade. Anticorpos anti-HCV só se tornam detectáveis no soro após o surgimento da resposta adaptativa e aumento subsequente de ALT (THIMME et al., 2002; LECHNER et al., 2000).

A maioria dos pacientes com hepatite C desenvolvem infecção crônica com alta persistência viral e a patogênese não é a consequência direta do efeito citopático do vírus nas células hepáticas, mas o resultado de uma resposta imune intermediária. Essa resposta é suficiente para induzir destruição hepática e fibrose,

mas não suficiente para erradicar os vírus de seus reservatórios, indicando que o HCV deve ter desenvolvido estratégias eficientes para escapar das respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro (POYNARD et al., 2003; MISSALE et al., 2004).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na eliminação do vírus da hepatite C são relacionados às respostas distintas Th1 e Th2, provenientes dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 seria responsável tanto pela incapacidade de eliminação do vírus da hepatite C como pela maior ou menor gravidade de lesão hepática (MISSALE et al., 1998). Demonstrou-se que indivíduos com a forma aguda da hepatite C possuem respostas anti-virais de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas quantitativamente maiores que os indivíduos com a forma crônica; porém, as respostas de células T específicas na hepatite crônica, apesar de diminuídas, são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose (POYNARD et al., 2003). A resposta imune humoral também desempenha papel fundamental na resposta contra o HCV e o “clearance” viral foi associado com produção de anticorpos anti-proteínas do envelope viral (FARCI et al., 1996).

Além disso, a maioria das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HCV específicas tipo 1 produtoras de IFN- $\gamma$  no fígado, após exercerem suas funções efetoras, entram em apoptose o que não ocorre em células T específicas tipo 2. Juntamente com a falta de co-estimuladores, fatores de crescimento e de sobrevivência, há a perda de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com atividade anti-viral, acúmulo de infiltrados de células apoptóticas e a lise de alguns hepatócitos infectados com secreção de citocinas inflamatórias. Estas estimulam a ativação de células estreladas hepáticas a produzirem proteínas da matriz extracelular iniciando o processo fibrogênico (RACANELLI; REHERMANN, 2003).

A mortalidade e morbidade associada a hepatite C crônica é resultante principalmente da fibrose hepática e suas complicações, como cirrose e hepatocarcinoma. A cirrose é o estágio final da progressão da fibrose hepática e vários fatores já definidos estão associados a essa progressão, incluindo duração da infecção, idade, sexo masculino, ingestão de álcool, presença de outras infecções como HIV e hepatite B (POYNARD et al., 2003).

Argumenta-se ainda que fatores relacionados aos vírus, como carga viral e genótipo poderiam também influenciar a progressão da fibrose na hepatite crônica

pelo HCV (PESSIONE et al., 1998). O genótipo 1b é o mais freqüentemente encontrado em várias partes do mundo incluindo Europa, Estados Unidos, Brasil e Japão e tem sido associado por alguns autores como fator de progressão para uma doença hepática mais severa, levando a conclusão que a patogenicidade parece ser maior que aquela com outros genótipos como o 2 e 3 que também são muito comuns.

Segundo Poynard et al. (2003), sabe-se que não há correlação entre severidade da doença (estágio da fibrose) e o genótipo viral. Entretanto, o genótipo 1b é sem dúvida o de pior resposta terapêutica ao interferon (STRAUSS, 2001).

Além disso, o estado imunológico do hospedeiro parece ser o fator mais importante envolvido na progressão da lesão hepática (PESSIONE et al., 1998). Assim, uma resposta imune vigorosa pode eliminar o HCV em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto em pacientes crônicos ou imunossuprimidos a doença evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos pacientes imunocompetentes (STRAUSS, 2001).

Outros mecanismos, incluindo a interferência de proteínas virais atuando tanto na imunidade inata, na deficiência da atividade dos interferons tipo 1, na função das células NK e células dendríticas, como também na imunidade adaptativa, atuando na inibição da diferenciação e proliferação de células T e apresentação de antígenos e no controle da apoptose. Além disso, a alta carga viral (que leva à exaustão da resposta adaptativa) e mutação viral em epitopos imunodominantes de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (que podem causar anergia ou antagonizar o reconhecimento de antígenos pelas células T) para escapar ao ataque das respostas de células T citotóxicas têm sido sugeridos para explicar a evolução para cirrose e hepatocarcinoma na infecção pelo HCV (MISSALE et al., 2004).

A recuperação da hepatite C pode ser seguida pelo declínio e eventual perda de anticorpos anti-HCV dentro de um período de 10-20 anos em alguns pacientes. A imunidade protetora específica para o HCV tem sido descrita em alguns estudos com chimpanzés que se recuperaram da infecção e é mediada por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas (NASCIMBENI et al., 2003).

Já que as respostas adaptativas são menores e estão deprimidas em pacientes crônicos e devido à natureza das *quasispecies*, parece que uma vacina

100% protetora será difícil de ser formulada. Porém, uma vacina que induza respostas imunes celulares fortes seria utilizada como uma forma de restauração terapêutica das respostas imunes celulares específicas nas fases iniciais da infecção crônica pelo HCV e poderia representar uma estratégia racional para obter a resolução da infecção e diminuir os danos hepáticos. Portanto, um maior entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na cronificação da hepatite C e na eliminação do vírus são necessários para o desenvolvimento de imunoterapia e vacina contra a doença (PAN et al., 2002).

#### 2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite C pode ser dividido em testes sorológicos para detecção de anticorpos e testes moleculares para detecção de partículas virais. Os testes sorológicos são usados em larga escala na triagem de doadores de sangue e têm reduzido o risco de infecção pós-transfusional, sendo os mais utilizados os testes imunoenzimáticos como o ELISA (POYNARD et al., 2003).

Altamente sensíveis e específicos, os testes imunoenzimáticos usados atualmente detectam anticorpos contra as proteínas do core e proteínas não-estruturais dentro de 4 -10 semanas de infecção. Esses testes são extremamente úteis no diagnóstico de hepatite crônica com transaminases elevadas e epidemiologia sugestiva para o vírus C; porém, podem ocorrer resultados falso-negativos nas fases iniciais da hepatite aguda (falseando o resultado em doadores de sangue), em indivíduos imunossuprimidos ou em qualquer grupo de indivíduos com baixo valor preditivo de risco de contaminação com o vírus C (PAWLOTSKY, 2002; STRAUSS, 2001). Pode-se solicitar ainda outros testes sorológicos confirmatórios como o imunoblot (RIBA) para descartar resultados falso-positivos em populações de baixo risco (STRAUSS, 2001).

Entretanto, o teste utilizado na confirmação de diagnóstico da infecção pelo vírus C é baseado na detecção molecular qualitativa de RNA viral no soro através de PCR ("Polymerase chain reaction"), sendo o teste mais específico para demonstrar a infecção pelo VHC com sensibilidade para detectar menos de 100 cópias de RNA

viral/ml de soro (POYNARD, 2003). As determinações quantitativas da carga viral são importantes no início do tratamento, juntamente com a genotipagem para definir duração e monitorar a resposta dos pacientes ao tratamento anti-viral (PAWLOTSKY, 2002).

## 2.2 Esquistossomose mansônica

### 2.2.1 Epidemiologia e transmissão

Assim como a hepatite C, a esquistossomose é uma doença parasitária crônica, apresentando prevalência apenas inferior à da malária. É portanto, uma doença importante do ponto de vista sócio-econômico e de Saúde Pública, ocorrendo particularmente em áreas tropicais e subtropicais, onde pode ser encontrada em suas formas mais graves. A esquistossomose é endêmica em 74 países em desenvolvimento, infectando mais de 200 milhões de pessoas em áreas rurais agrícolas e peri-urbanas, estimando-se que 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões sofrem das conseqüências severas da doença com acometimento hepatoesplênico (World Health Organization, 1996).

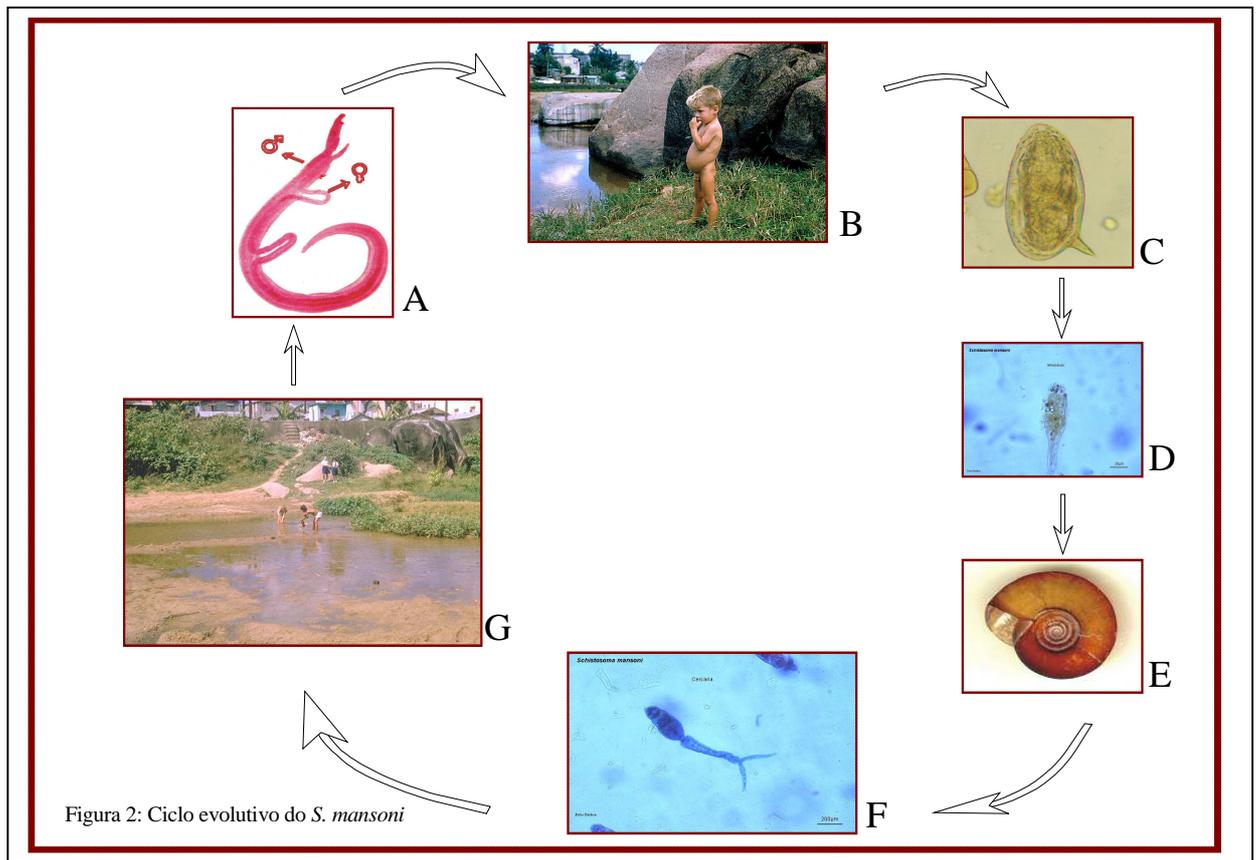
A prevalência da infecção no Brasil foi estimada em 1971 entre 5 a 6 milhões (REY, 2001) e atualmente a área de transmissão da esquistossomótica compreende 17 das 27 unidades federais sendo que os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais apresentam as maiores prevalências (AMARAL, PORTO, 1994).

Em Pernambuco, a área endêmica ocupa 79 dos 167 municípios do estado, dos quais 55 estão na zona Litoral-Mata e 24 no Agreste (FAVRE et al., 2001).

As espécies do gênero *Schistosoma* chegaram às Américas durante o tráfico de escravos e com os imigrantes orientais e asiáticos. Entretanto, somente o *Schistosoma mansoni* aqui se fixou por encontrar bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes às da região de origem (NEVES, 1995).

As três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* que são importantes para a transmissão da esquistossomose no Brasil são: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* e se encontram distribuídas de Norte a Sul no país (MALAGUEÑO; SANTANA, 1994). Através da distribuição geográfica, foi observado que das três espécies que albergam o parasito, duas estão presentes na região Nordeste, são elas: a *B. glabrata* e a *B. straminea*.

O *S. mansoni* é um platelminto da classe *Trematoda*, ordem *Digenea* e família *Schistosomatidae* (NEVES, 1995). O *Schistosoma* possui sexos separados (dióicos) e acentuado dimorfismo sexual. O ciclo vital é heteroxeno, com vários estádios larvários e pelo menos um hospedeiro intermediário (REY, 2001).



**Figura 2. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni***

A- Vermes adultos acasalados. B- Eliminação dos ovos nas fezes. C- Ovo de *S. mansoni*. D- Miracídio. E- Hospedeiro intermediário do gênero *Biomphalaria*. F- Cercárias. G- Hospedeiro definitivo (homem) em contato com águas contaminadas.

Os ovos do *S. mansoni* são liberados no exterior pelo hospedeiro vertebrado infectado junto com as fezes, contaminando coleções de água. Os ovos liberam os miracídios que por sua vez penetram nos moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria*, se desenvolvem e se multiplicam como esporocistos, transformando-se em cercárias, que voltam ao meio líquido e são as formas infectantes para o homem e outros hospedeiros vertebrados. A transmissão da esquistossomose ocorre após penetração ativa das cercárias através da pele ou mucosas do

hospedeiro vertebrado. Essas perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que migram através da corrente sanguínea ou linfática até o sistema porta-intra-hepático, se desenvolvem e transformam-se em vermes adultos num período de aproximadamente 30 dias. Após atingir a sua maturação sexual, os vermes adultos migram acasalados, contra a corrente circulatória, e alcançam as ramificações mais finas da veia mesentérica inferior e as vênulas do plexo hemorroidário superior, onde as fêmeas fazem a postura dos ovos ao nível de mucosa ou submucosa seja do reto ou sigmóide ou regiões mais altas do intestino (REY, 2001). Os ovos podem atravessar a mucosa e chegar até a luz intestinal para serem eliminados com as fezes e os que não conseguirem poderão ficar presos na mucosa intestinal ou ser arrastados para o fígado. Os primeiros ovos são vistos nas fezes cerca de 40 dias após a infecção do hospedeiro (NEVES, 1995).

### 2.2.2 A doença

Após o contato do homem com águas contaminadas pelas cercárias do *S. mansoni*, surge no local de penetração na pele, uma sensação pruriginosa. Associado ao prurido, verifica-se erupção caracterizada por micropápulas eritematosas e discretamente edemaciadas: a dermatite cercariana. Nas zonas endêmicas, esses fenômenos, geralmente passam despercebidos pelos pacientes (HUGGINS; SANTOS, 1994).

Após o desaparecimento dos sintomas cutâneos, ocorre um período de incubação, de quatro a oito semanas, no qual há o desenvolvimento das formas imaturas do helminto (esquistossômulos). Frequentemente, a fase inicial, aguda ou toxêmica, não é evidenciada nos moradores da região endêmica, é a denominada forma inaparente.

A fase aguda pode ter início abrupto, súbito ou explosivo e caracteriza-se por febre elevada, mal estar geral, astenia, indisposição, tosse seca incomodativa ou crise asmátiforme, anorexia, náuseas e vômitos, mialgias e cefaléia. Ao exame físico nota-se emagrecimento, desidratação, hepatoesplenomegalia, microadenomegalia, taquicardia, e hipotensão arterial (HUGGINS; SANTOS, 1994). O quadro

hematológico é de leucocitose moderada, com intensa eosinofilia que chega, por vezes, a níveis de 25 e 50% dessas células. O quadro típico da esquistossomose aguda apresenta-se, em sua maioria, entre os jovens e adultos que visitam as regiões endêmicas e aí se expõem à infecção (REY, 2001).

A doença esquistossomótica evolui de acordo com a idade do indivíduo na infecção na exposição inicial, a frequência de exposições, a intensidade da infecção e outros fatores relacionados (como carga parasitária, estado nutricional e resposta imune do indivíduo) que estabelecem um amplo espectro de formas clínicas, desde formas leves, assintomáticas, predominantes em habitantes de áreas endêmicas, até formas graves e limitantes (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

A fase crônica da esquistossomose mansônica apresenta em sua evolução, etapas distintas, que justificam a sua classificação em formas anatomoclínicas, elaborada durante reunião de tropicalistas e hepatólogos em Belo Horizonte, 1975 (AMARAL; PORTO, 1994).

Nas áreas endêmicas onde a fase aguda é inaparente, os indivíduos já são diagnosticados em plena fase crônica, e a grande maioria sem sintomas ou com sintomas pouco intensos. Apenas uma proporção de indivíduos que adquirem uma maior carga de infecção ou que são expostos a reinfecções sucessivas, evoluem para as fases mais avançadas e sintomáticas da doença. Esse processo evolutivo relacionado com a intensidade da infecção e outros fatores ligado ao parasito, ao hospedeiro e ao meio ambiente, permitem classificar os pacientes nas formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

As manifestações clínicas das formas intestinal e hepatointestinal são praticamente as mesmas, havendo na forma hepatointestinal maior acometimento hepático, estando o fígado aumentado no exame clínico, principalmente o lobo esquerdo. O baço não é palpável nessas formas clínicas. Os sintomas gerais, também encontrados em populações de não esquistossomóticos, da mesma região, são caracterizados por desânimo, indisposição para o trabalho, emagrecimento e tonturas e estão relacionados a subnutrição e outras parasitoses. A sintomatologia digestiva é bastante variada e não se observa nenhuma manifestação de insuficiência hepática. Pode se encontrar também, leve anemia decorrente da perda crônica de sangue pelo intestino ao lado do estado carencial da grande maioria dos

doentes das áreas endêmicas e eosinofilia sangüínea periférica (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

As alterações hepáticas típicas surgem a partir do início da oviposição e formação de granulomas. Estes se formam em torno dos ovos do parasito e são a lesão típica e elemento anatomopatológico básico do processo esquistossomótico crônico (REY, 2001).

Entretanto, a simultaneidade do processo inflamatório em torno de muitos ovos e a contínua produção de mais ovos pelas fêmeas levam os nódulos fibróticos a confluir, formando extensas áreas cicatriciais que, pouco a pouco, vão alterando a arquitetura dos tecidos onde se encontram. Muitos ovos ficam retidos nos capilares dos espaços porta do fígado, aí os granulomas se acumulam, levando ao desenvolvimento de um verdadeiro manguito fibroso em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta. Esta disposição sistematizada do tecido reacional recebe os nomes de fibrose periportal ou de “fibrose em haste de cachimbo de barro” (*clay pipe stem fibrosis*) que é característica da esquistossomose (REY, 2001).

A fibrose periportal conduz à hipertensão porta, à esplenomegalia e à circulação colateral, devido ao bloqueio da circulação pré-sinusoidal pelo desenvolvimento do tecido fibroso cicatricial, que reduz o fluxo sangüíneo do território irrigado pela veia porta. O baço aumenta de tamanho em parte devido a congestão venosa do ramo esplênico (veia esplênica do sistema porta) e também à hiperplasia das células do sistema macrófago–linfocitário, com diferenciação plasmocitária e produção de gamaglobulinas, como ocorre habitualmente nas respostas à presença de grande quantidade de substâncias antigênicas (REY, 2001).

A forma hepatoesplênica caracteriza-se pelo comprometimento e crescimento do fígado e baço (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994) e os sintomas observados nesses pacientes são: má digestão, sensação de plenitude gástrica após as refeições, flatulência, dor abdominal difusa, inapetência, emagrecimento, desânimo, indisposição geral, irritabilidade e nervosismo. Na esquistossomose hepatoesplênica, predominam as manifestações decorrentes da hipertensão porta e clinicamente isso se traduz pela presença de varizes esôfago-gástricas, cuja ruptura é responsável por hemorragias em geral graves e algumas vezes fatais. A hematêmese é uma das manifestações clínicas importantes e, em geral, guarda

relação com o grau de hipertensão porta. No sangue há a presença de anemia, leucopenia (neutropenia e eosinofilia) e plaquetopenia que se apresentam isoladas ou associadas e são atribuíveis ao hiperesplenismo (REY, 2001; ABATH et al., 2006).

### 2.2.3 Imunopatologia

Os granulomas esquistossomóticos são compostos de fibras colágenas, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e plasmócitos ao redor dos ovos do parasita e sua formação depende predominantemente de células T CD4<sup>+</sup>, representando uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (PEARCE; MACDONALD, 2002). Por isso, era esperado que as citocinas Th1 controlassem a imunidade contra esse parasito (WYNN; CHEEVER, 1995). Entretanto, estudos em camundongos infectados com *S. mansoni* revelaram uma diminuição da resposta Th1 concomitantemente a um aumento das citocinas Th2 no momento da oviposição, sugerindo um envolvimento maior de citocinas do tipo Th2 na formação da lesão granulomatosa (GRZYCH et al., 1991; PEARCE et al., 1991).

De fato, foi demonstrado em modelo murino que as citocinas tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-13 e IL10, inibem a ativação clássica de macrófagos, levando a expressão aumentada de arginase com produção de prolina, aminoácido essencial na produção de colágeno. Portanto, têm sido implicadas na formação de granuloma e fibrogênese e na presença de eosinófilos nas lesões granulomatosas. Ao contrário, as citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  ativam macrófagos pela via clássica, com aumento na produção de óxido nítrico e citrulina, inibindo a produção de arginase, sendo a resposta tipo 1 relacionada à imunidade contra a infecção. (HESSE et al., 2001; MORAIS et al., 2002).

Além da ação contra-regulatória das citocinas tipo 1 e 2 no controle do “status” da ativação macrofágica e fibrose, essas citocinas exibem importante papel nos fibroblastos hepáticos, inibindo ou estimulando a síntese de proteínas da matriz extracelular, respectivamente (HENRI et al., 2002).

Chiaromonte et al. (1999) e Fallon et al. (2000) demonstraram o papel da IL-13 estimulando a produção de colágeno *in vitro* por fibroblastos e como mediador fibrogênico principal na esquistossomose murina juntamente com a IL-4 e TGF- $\beta$ , em contraste com as citocinas Th1 IFN- $\gamma$  e IL-12, que exibem atividades anti-fibróticas, sendo o IFN- $\gamma$  associado com a redução da deposição de colágeno na cicatrização normal e fibrose pulmonar.

Em humanos, a infecção pelo *S. mansoni* é associada com elevados níveis de IgE e eosinofilia, característicos de uma resposta de citocinas tipo 2. Além disso, células mononucleares periféricas obtidas de indivíduos infectados estimuladas *in vitro* mostram geralmente a produção de citocinas tipo 2. Após vários anos de exposição à infecção, indivíduos adultos desenvolvem imunidade protetora parcial contra a reinfecção. O desenvolvimento de imunidade, em parte, depende da exposição cumulativa à infecção e esta imunidade desempenha um papel significativo para controlar os níveis de infecção (HAGAN et al., 1991; HAGAN, ABATH, 1992).

Portanto, no contexto do paradigma Th1-Th2, estudos em camundongos e humanos, caracterizaram a esquistossomose como uma doença predominantemente tipo 2, associando essas respostas com a morbidade (MORAIS et al., 2002). Esse conceito resultou em diversas pesquisas na tentativa de prevenir as respostas tipo 2 para reduzir a morbidade. Porém, em estudos com camundongos deficientes na produção de IL-4 e IL-10, os quais exibiam uma resposta tipo 1 predominante ao ovos de *Schistosoma*, mostraram produção de granulomas menores, porém com aumento da hepatotoxicidade e mortalidade desses animais, sugerindo que a resposta tipo 2 é necessária para sobrevivência (FALLON et al., 2000; HOFFMANN et al., 2000; EDWARDS et al., 2005).

Apesar da presença predominante de respostas tipo 2 em humanos infectados com *S. mansoni*, a resposta imune parece ser diferente de acordo com a forma clínica da doença. Estudos têm sugerido que as citocinas pró-inflamatórias tipo 1 estejam relacionadas a morbidade (FALLON, 2000; MORAIS et al., 2002).

De fato, não há evidências que sugiram que a imunopatologia em humanos é dirigida por citocinas tipo 2. Montenegro et al. (1999) associaram a fase inicial da doença a uma produção importante de IFN- $\gamma$  e que a citocina IL-10 contribui para a supressão da resposta imune na infecção crônica e aguda. Os resultados obtidos

através desses estudos sugerem que a doença hepatoesplênica em humanos está associada com respostas de citocinas tipo 1 (FALLON et al., 2000). MWATHA et al. (1998) associaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e baixos níveis de IL-5 com a presença de hepatoesplenomegalia. De maneira similar, Montenegro et al. (1999) demonstraram que existia uma marcada produção de IFN- $\gamma$  e não de IL-4 e IL-5 por esplenócitos de pacientes esquistossômicos hepatoesplênicos estimulados por antígenos do parasito. Ao contrário, estudos desenvolvidos por Ribeiro de Jesus et al. (2004) associaram níveis elevados das citocinas Th2 IL-13 e IL-5 com fibrose hepática severa, confirmada através de ultrassonografia como fibrose grau III, nos estágios iniciais da forma hepatoesplênica, onde os pacientes possuíam baço com tamanho pequeno e não apresentavam passado de hemorragia digestiva ou outros sinais de hipertensão porta severa. Além disso, estudos realizados por Henri et al. (2002) e Booth et al. (2004) em humanos infectados com *S. mansoni* mostraram que altos níveis de TNF- $\alpha$  estavam associados com hepatoesplenomegalia enquanto a citocina anti-fibrogênica IFN- $\gamma$  estaria relacionada com proteção contra fibrose hepática severa.

Com base na presente revisão, concluiu-se que não há nenhum consenso na literatura atual sobre que perfil de produção de citocinas tipo 1 ou tipo 2 é predominante e atua regulando a transição de uma minoria de pacientes crônicos que evoluem das formas clínicas leves intestinal e hepatointestinal para a forma mais grave, a hepatoesplênica, com fibrose periportal severa e hipertensão portal.

Embora haja evidências em estudos com modelo murino da esquistossomose sobre o papel da IL-13 como principal mediador fibrogênico e citocinas tipo 2 no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática, a contribuição das citocinas tipo 1 e 2 na fibrose hepática em humanos permanece não esclarecida (ABATH et al., 2006).

#### 2.2.4 Diagnóstico

Os quadros clínicos com sinais e sintomas característicos podem sugerir o diagnóstico de esquistossomose mansônica principalmente se o paciente vive ou

procede de uma zona endêmica, ou se o mesmo teve contato com águas de um foco de transmissão conhecido. Entretanto, devido a inespecificidade e a inconstância dos sinais e sintomas clínicos, somente o uso de testes laboratoriais e ultrasonografia podem fornecer elementos seguros para justificar o diagnóstico (REY, 2001).

O diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica pode ser realizado por meio de métodos diretos ou indiretos. Os principais métodos diretos são: 1) detecção dos ovos dos parasitos nas fezes (exames parasitológicos) ou 2) nos tecidos de indivíduos infectados, os exames anatomopatológicos e 3) detecção de antígenos derivados do parasito na circulação sanguínea ou urina sendo usados como controle de cura da doença (DOENHOFF et al., 2004).

A demonstração dos ovos do parasito nas fezes ou em material de biópsia de indivíduos infectados constitui o diagnóstico de certeza na esquistossomose. Porém, resultados negativos em exames parasitológicos não excluem a possibilidade de infecção, principalmente quando se trata de paciente com infecção leve ou em fase crônica e em áreas de baixa endemicidade onde a carga parasitária é muito pequena (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Os métodos indiretos ou imunológicos são aqueles que envolvem a detecção de anticorpos anti-schistosoma específicos e são justificados nesses casos por apresentarem maior sensibilidade sendo usados principalmente como métodos auxiliares em levantamentos epidemiológicos (COELHO; TAVARES, 1991).

Apesar de existir uma grande variedade de testes sorológicos para a esquistossomose, eles são de pouco valor no diagnóstico, devido a: reações cruzadas que ocorrem, principalmente com outras helmintoses; não se correlacionam com a intensidade da infecção e esses exames podem permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica. Em razão disso, a visualização microscópica do ovo do *S. mansoni*, ainda é o mais largamente utilizado, principalmente pelo seu baixo custo operacional (SMITHERS; DOENHOFF, 1982; RABELLO, 1997).

## 2.3 Co-infecção Hepatite C e esquistossomose

### 2.3.1 Epidemiologia e resposta imune

A co-infecção pela hepatite C e esquistossomose é comum no Egito e outros países em desenvolvimento como o Brasil (EL-KADY et al., 2004). E, em Pernambuco, onde a esquistossomose é endêmica, as duas doenças co-existem com frequência (PEREIRA et al., 1995).

Andrade (1962) e Dusek et al. (1965) salientaram que a hepatite crônica associada à esquistossomose agrava a doença hepática causada pelo *Schistosoma mansoni*. A razão para essa associação seriam as transfusões de sangue em grande quantidade devido às hemorragias digestivas secundárias às varizes esofagianas causada pela hipertensão portal esquistossomótica, que aumentam o risco de contaminação com hepatite C neste grupo (CID et al., 1985; SARNO et al., 1985).

O *S. mansoni* é capaz de atuar modificando a resistência do hospedeiro às infecções através da modulação da resposta imune. Essas alterações imunológicas vão depender da carga parasitária, de fase da doença, do tempo de duração da infecção esquistossomótica e das condições do hospedeiro (LAMBERTUCCI, 1993; 1994; SERUFO; LAMBERTUCCI, 1997). A infecção pelo *S. mansoni* em camundongos é caracterizada por uma resposta imune celular associada a um perfil de citocinas Th2 predominante e concomitante regulação negativa da resposta Th1 anti-viral (KAMAL et al., 2001). Como o fígado é o principal alvo de ambos os patógenos, a co-infecção com *S. mansoni* poderia levar a um imunocomprometimento localizado da resposta imune celular e assim favorecer a multiplicação viral e lesões hepáticas mais severas, permitindo a cronicidade da hepatite C (SERUFO; LAMBERTUCCI, 1997; FARID et al., 2005).

Segundo Kamal et al. (2000) e El-Kady et al (2004), pacientes co-infectados com HCV e esquistossomose exibem um padrão clínico, virológico e histológico peculiar manifestado por persistência viral com altos títulos de RNA de HCV, assim como acentuada necrose, inflamação e fibrose, além de alta incidência de cirrose e

hepatocarcinoma e resposta diminuída à terapia com IFN- $\gamma$  comparados com pacientes infectados apenas com HCV.

Kamal et al. (2001) realizaram um estudo de coorte em pacientes egípcios co-infectados, pacientes com HCV e pacientes com esquistossomose apenas, para investigar a possibilidade de que esta diferença clínica observada no curso da infecção em pacientes co-infectados poderia estar relacionada com a alteração das respostas proliferativas de células T CD4+ específicas para o HCV e padrão de citocinas produzidas seria causada pela esquistossomose.

Nesse estudo, a estimulação das PBMC com antígenos HCV produz uma resposta de citocinas predominantemente de perfil Th1 em pacientes com HCV apenas, comparado com um padrão de citocinas Th2 em pacientes co-infectados. Esses achados sugerem que a inabilidade de gerar uma resposta específica de células T CD4+ subtipo Th1 nos pacientes co-infectados desempenha um papel crítico na persistência e severidade do HCV em pacientes com esquistossomose. Os pacientes co-infectados selecionados para o estudo tinham infecção esquistossomótica prévia antes de se infectarem pelo HCV através de transfusões sanguíneas e principalmente pelo uso de tratamento parenteral com seringas de vidro não esterilizadas usadas para o tratamento em massa da população no Egito contra a esquistossomose. Portanto, encontrava-se um padrão de citocinas Th2 pré-estabelecido nesses pacientes. Sugere-se, portanto, que o padrão de citocinas Th2 produzido pelo *S. mansoni* antagoniza ou regula negativamente as atividades anti-virais das citocinas Th1, resultando num aumento da replicação viral e mais agressiva progressão para fibrose (KAMAL et al., 2001).

Um outro estudo realizado no Egito por Gad et al. (2001) demonstrou resultados divergentes ao grupo de Kamal et al. (2001). Este grupo observou níveis de ALT (alanina amino transferase) e níveis de carga viral significativamente mais baixos em pacientes co-infectados com HCV e *S. mansoni* comparando-se àqueles infectados com HCV apenas, independente da presença ou ausência de cirrose. Estes resultados sugeriram uma interação da esquistossomose com o sistema imune do hospedeiro aos quais foram relacionados em trabalhos de Dessein et al. (1999) mostrando que a fibrose hepática avançada na esquistossomose é controlada por um locus que codifica o gene do receptor de IFN- $\gamma$ . Esta citocina

estimula respostas Th1, que são conhecidas por suprimir atividade do HCV nos indivíduos infectados.

Ainda discordando do grupo de Kamal et al. (2001), Shiha e Zalata (2002), concluíram que a esquistossomose não leva à progressão da fibrose em pacientes com hepatite C e que a fibrose periportal esquistossomótica não interfere na avaliação do grau de fibrose na hepatite C através de ultrassonografia e biópsia hepática.

Mais recentemente, Kamal et al. (2004, 2006) em dois coortes prospectivos avaliaram a cinética de células T CD4<sup>+</sup> HCV específicas e marcadores séricos de fibrose hepática em pacientes com HCV com ou sem esquistossomose em relação a taxa de progressão de fibrose hepática. No primeiro estudo, foram comparadas a histologia hepática com as respostas proliferativas de células T CD4<sup>+</sup> HCV específicas intrahepáticas e periféricas e dosagem de citocinas em indivíduos com HCV com ou sem co-infecção com a esquistossomose em duas ocasiões: a primeira biópsia foi realizada 6-10 meses após a infecção aguda e a segunda realizada após 8 anos para se avaliar a taxa de progressão da fibrose nesses pacientes. Os resultados encontrados foram que os pacientes co-infectados mostraram uma taxa de progressão de fibrose mais rápida que aqueles com HCV apenas e que essa taxa de progressão estaria associada com a falha de desenvolvimento de respostas de células T CD4<sup>+</sup> Th1 específicas nos estágios iniciais da infecção pelo HCV, sugerindo que o *S. mansoni* estaria inibindo essas respostas nos pacientes co-infectados (KAMAL et al., 2004).

O segundo estudo, publicado em 2006, foi um coorte longitudinal onde pacientes com HCV com ou sem esquistossomose foram acompanhados durante 10 anos. Os pacientes realizaram 2 biópsias hepáticas, uma 8-10 meses após a infecção aguda e a segunda após 10 anos da realização da primeira. A taxa da fibrose hepática foi comparada com níveis de marcadores séricos e intrahepáticos incluindo as citocinas TNF- $\alpha$  (pró-inflamatória) e TGF- $\beta$  (pró-fibrótica) em ambos os grupos de pacientes. A taxa de progressão da fibrose foi de 0,61 unidades de fibrose por ano no grupo de co-infectados em comparação a taxa de 0,1 unidades de fibrose por ano no grupo com HCV apenas e que os níveis séricos dos marcadores de fibrose se correlacionaram com a taxa de progressão da fibrose, identificando

aqueles pacientes com rápida progressão daqueles com a doença estável (KAMAL et al., 2006).

Devido a divergências encontradas na literatura, o grau das lesões necro-inflamatórias, estágio da fibrose e a possível relação sinérgica da co-infecção hepatite C e esquistossomose para uma progressão à doença hepática severa permanece não esclarecida.

### 2.3.2 Biópsia hepática e marcadores biológicos

Na hepatite C, a biópsia hepática é considerada o padrão-ouro para acessar o estágio da fibrose relativa ao HCV. E o estágio da fibrose (severidade da doença) é fundamental na determinação de decisões sobre tratamento e a sua duração (POYNARD et al., 2003). No entanto, a biópsia hepática é um procedimento invasivo e portanto tem potencial para complicações. Após a biópsia, 30% dos pacientes sentem dor, 0,3% tem complicações graves (incluindo sangramento) e 0,03% morrem. Além disso, existe o alto custo do exame e erro de amostragem gerando variação na interpretação do grau de fibrose e proporcionando uma visão estática do processo fibrogênico já que uma amostra de biópsia hepática representa apenas uma pequena parte do órgão como um todo (LICHTINGGHAGEN; BAHR, 2004).

Como resultado dessas limitações, vários estudos na literatura surgiram como importante campo de pesquisa na tentativa de desenvolver métodos não invasivos através de marcadores biológicos séricos (marcadores bioquímicos e citocinas envolvidas na regulação da fibrose) para avaliar o grau/ estágio da fibrose hepática na hepatite C (IMBERT-BISMUT et al., 2001; FREEMAN et al., 2003; MYERS et al., 2002; POYNARD et al., 2004; POYNARD et al., 2005) e na esquistossomose humana (BUCHARD et al., 1998; RICARD-BLUM et al., 1999; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002).

Embora na esquistossomose não haja uma indicação de biópsia hepática nos pacientes, os marcadores biológicos não invasivos preditores de fibrose são importantes no seguimento da evolução da doença possibilitando a avaliação da

transição das formas leves para as formas mais graves e acompanhamento da terapêutica.

Um marcador não- invasivo ideal para a avaliação da fibrose hepática deve ser um preditor acurado da presença ou ausência de fibrose significativa (alta sensibilidade e especificidade, e elevado valor preditivo positivo e negativo), baixo custo, ser rapidamente avaliado, reproduzível com baixas variações inter e intra-laboratoriais e com aplicabilidade em doenças de várias etiologias e ser sensível ao tratamento da doença (THULUVATH; KROK, 2006).

Existem vários marcadores bioquímicos séricos ou combinação de marcadores sendo testados em diferentes países, inclusive no Brasil. Sendo os mais estudados e amplamente testados o FibroTest e ActiTest do grupo francês coordenado por Poynard et al. (2002). O FibroTest usa a combinação de 5 marcadores bioquímicos ( $\alpha$ -2 macroglobulina,  $\gamma$ -glutamil transferase, haptoglobulina, apolipoproteína A1 e bilirrubina total) para avaliar o estágio da fibrose e o ActiTest usa a combinação dos mesmos 5 marcadores do FibroTest incluindo a alanina amino transferase (ALT) para avaliar o grau de atividade necro-inflamatória hepática. Outros testes que vêm sendo utilizados para avaliar fibrose hepática são relação AST/ALT (WILLIAMS; HOOFNAGLE, 1988), o APRI ou relação AST/plaquetas (WAI et al., 2003) e o índice de Forns que utiliza uma fórmula calculada através do número de plaquetas,  $\gamma$ -glutamil transferase, idade e colesterol (FORNS et al., 2002).

Apesar de demonstrarem excelente valor preditivo para fibrose leve e cirrose e relação risco/benefício superior à biópsia, esses testes ainda apresentam resultados falso-negativos e positivos e encontram dificuldades em diagnosticar níveis intermediários de fibrose (POYNARD et al., 2004, 2005).

A maioria dos marcadores bioquímicos séricos como alternativa para biópsia hepática têm sido estudados em pacientes com Hepatite C. O presente estudo visa portanto, estudar outros marcadores biológicos, incluindo citocinas pró-fibróticas e pro-inflamatórias, não apenas na hepatite C, mas na esquistossomose e na co-infecção.

### 2.3.3 Fibrose hepática

Tanto a esquistossomose como a hepatite C desenvolvem fibrose hepática por mecanismos imunológicos diferentes. Na esquistossomose a fibrose é decorrente de uma resposta imune granulomatosa ao redor dos ovos do parasita presos nos sinusóides hepáticos e apesar de elevada, a fibrose é limitada às veias portas, apresentando uma distribuição longitudinal, a fibrose periportal, podendo levar a hipertensão porta e óbito por sangramento digestivo alto, mas não há comprometimento do parênquima hepático nem progressão para cirrose (SHIHA; ZALATA, 2002; ABATH et al., 2006). Na hepatite C a fibrose é decorrente de uma resposta imune ineficiente para eliminar o vírus, mas suficiente para gerar fibrose, inflamação e necrose, sendo distribuída de maneira homogênea por todo parênquima hepático e podendo evoluir para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; SHIHA; ZALATA, 2002).

A fibrose hepática é uma reação típica a uma lesão crônica como a persistência de infecções virais e helmínticas. É um processo dinâmico, regulado, não estático, sendo caracterizada por um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (ECMP), resultando num balanço entre esse excesso de produção e diminuição da sua degradação (FRIEDMAN, 2000).

O evento central da fibrogênese é a ativação de células estreladas hepáticas (células de Ito) em miofibroblastos. Citocinas e seus receptores, produtos da peroxidação lipídica e outros produtos da inflamação, incluindo aqueles liberados por células danificadas estimulam a diferenciação das células estreladas em miofibroblastos que secretam ECMP no espaço perisinusoidal de Disse (HENRI et al., 2002; POKROVSKII et al., 2003).

As principais citocinas que regulam diferencialmente a produção de ECMP são: TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-13, IL-5, IL-10. Estudos em humanos e camundongos com esquistossomose mostraram uma forte atividade anti-fibrogênica do IFN- $\gamma$  e de fato essa citocina atua inibindo a produção de ECMP pelas células estreladas e aumentando a atividade da colagenase no fígado através da estimulação da síntese das metaloproteinases (MP) e da inibição da síntese dos

inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP) (DESSEIN et al., 1999; HENRI et al., 2002).

Em modelo murino da esquistossomose, as citocinas TGF- $\beta$ , IL-13 e IL-4 são fibrogênicas e estimulam as células estreladas hepáticas a se transformarem em miofibroblastos e exercem o efeito oposto ao IFN- $\gamma$  na síntese das ECMP e TIMPs (CHIARAMONTE et al., 1999, 2001). Além disso, a citocina IL-4 e TNF- $\alpha$  são consideradas pró-inflamatórias (HENRI et al., 2002).

Estudos em humanos com hepatite C, estabeleceram que os níveis séricos da citocina TNF- $\alpha$  refletiam a severidade da reação necro-inflamatória hepática, enquanto os níveis de TGF- $\beta$  estavam relacionados com a fibrose (NEUMAN et al., 2002).

Além disso, durante o processo fibrogênico e inflamação ocorre um aumento não só de produtos do metabolismo das ECMP (colágenos I e III, ácido hialurônico), como também de enzimas hepáticas circulantes.

O ácido hialurônico tem sua produção aumentada pelas células estreladas hepáticas e diminuição de sua eliminação pelas células endoteliais sinusoidais durante a fibrogênese e além disso, sua eliminação depende do fluxo sinusoidal e pressão da veia porta. Por isso, seus níveis encontram-se elevados em doenças hepáticas seguidas de fibrose e hipertensão portal. Em estudos na esquistossomose humana, hepatite C e pacientes com doença hepática induzida por álcool, o ácido hialurônico foi associado como um bom marcador para diagnosticar fibrose e diferenciar pacientes com formas mais leves sem hipertensão portal daqueles com hipertensão portal na esquistossomose e pacientes cirróticos seja por vírus ou álcool (KÖPKE- AGUIAR et al., 2002).

Entre as enzimas hepáticas, aquelas associadas a agressões aos ductos biliares ( $\gamma$ - glutamil transferase e fosfatase alcalina), possivelmente encontram seus níveis elevados na cirrose hepática; as que estão associadas a danos celulares, as transaminases, alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), sendo liberadas dos hepatócitos e se relacionando a atividade da doença (FONTANA, LOK, 2002; GEBO et al., 2002). Ainda podemos avaliar laboratorialmente as hepatopatias através de alterações em testes que avaliam a síntese protéica (tempo de protrombina, proteínas totais, albumina e gamaglobulina) que são úteis para avaliar cirrose, mas tem pouca sensibilidade em detectar estágios

iniciais de fibrose e a avaliação do número de plaquetas, cuja diminuição moderada na esquistossomose é marcador de hipertensão portal (SOUZA; TOLEDO; BORGES, 2000) e na hepatite C estaria relacionada como marcador de cirrose hepática (RENOU et al., 2000).

O aumento das bilirrubinas pode ocorrer nas lesões hepatocelulares como hepatites aguda e crônica e cirrose, assim como nas obstruções dos ductos biliares. Nas hepatites, ambas as frações podem estar elevadas mas, a bilirrubina direta parece predominar e ao invadir os espaços perivasculares necrosados ou através da própria circulação sinusoidal vai se acumular na corrente sanguínea. Nas obstruções dos ductos biliares a bilirrubina conjugada ou direta também parece predominar sem afetar os níveis da bilirrubina indireta, sofrendo refluxo para a corrente sanguínea (RAVEL, 1995).

As relações AST/ALT e AST/plaquetas têm sido avaliadas como marcadores de cirrose hepática (LICHTINGHAGEN; BAHR, 2004).

Portanto, vários marcadores bioquímicos e citocinas desempenham papel fundamental no desenvolvimento da fibrose hepática e inflamação e têm seus níveis aumentados durante a fibrogênese tanto na hepatite C quanto na esquistossomose. Com isso, a identificação de citocinas e marcadores bioquímicos circulantes específicos como marcadores não invasivos de fibrose hepática é de importância fundamental na determinação do estágio da fibrose, da atividade, acompanhamento da terapia e diagnóstico dessas doenças.

#### 2.3.4 Justificativa

Em virtude de existirem na literatura contribuições inconclusivas relacionando a co-infecção hepatite C e esquistossomose, esse trabalho contribuirá para um maior entendimento dos mecanismos imunológicos, processos fibrogênicos e marcadores biológicos não invasivos preditores de grau de fibrose envolvendo essas patologias, na tentativa de monitorar as doenças através da determinação do início da terapia e seu acompanhamento, como também intervindo no sentido de atenuar a progressão para as formas mais graves, melhorando a qualidade de vida dos

pacientes. Além disso, todo esse conhecimento é de fundamental importância para o desenvolvimento de imunoterapia, já que até o momento não há vacinas contra a hepatite C e a esquistossomose.

### 2.3.5 Pergunta condutora

Existe associação entre a gravidade da doença na hepatite C, esquistossomose e a co-infecção hepatite C-esquistossomose com:

- níveis de citocinas envolvidos na fibrogênese?
- níveis de marcadores bioquímicos da fibrose hepática?

### 2.3.6 Hipótese do estudo

Níveis elevados de marcadores bioquímicos e citocinas pró-fibróticas estão associados com a gravidade da fibrose hepática na hepatite C, esquistossomose e na co-infecção hepatite C-esquistossomose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar marcadores biológicos que possam ser utilizados para previsão de gravidade de fibrose hepática na hepatite C, esquistossomose e co-infecção.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Determinar os graus de fibrose e atividade inflamatória nos pacientes estudados através de ultrassonografia e da análise histopatológica das biópsias hepáticas.
- ✓ Determinar os níveis séricos dos marcadores bioquímicos: bilirrubinas, eletroforese de proteínas, transaminases, gamma- glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina e ácido hialurônico.
- ✓ Avaliar os níveis séricos de TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13.
- ✓ Estudar os níveis de IL-13 e IFN- $\gamma$  *in situ* nas biópsias hepáticas
- ✓ Determinar as associações entre os níveis de IL-13 e IFN- $\gamma$  *in situ*, citocinas séricas, marcadores bioquímicos e graus de fibrose em cada grupo.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção de pacientes, exame clínico e laboratorial**

Pacientes de ambos os sexos com idade variando de 18 a 65 anos foram selecionados no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE, através de exame clínico, laboratorial, ultrassonografia abdominal e biópsia hepática. Os seguintes grupos foram selecionados: pacientes com hepatite C (n=37), hepatite C/ esquistossomose hepatoesplênica ou co-infectados (n=19) e com esquistossomose hepatoesplênica (n=23). As amostras estudadas foram amostras de conveniência. O tamanho destas amostras foi limitado pelos custos operacionais e esperamos que as diferenças ou correlações observadas sejam grandes o suficiente para permitirem a negação da hipótese nula.

Os pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos (EHE) foram estudados após tratamento específico, devido à ocorrência de re-infecções, que fazem com que esses pacientes sejam tratados pelo sistema de saúde, dificultando a seleção de pacientes sem tratamento. Por outro lado, os pacientes com hepatite C não apresentaram esse problema, e foram selecionados sem tratamento prévio. Portanto, estas situações não foram provocadas pelo desenho de estudo, mas foram decorrentes das características destas doenças e atividades do sistema de saúde.

Os pacientes com hepatite C tiveram o diagnóstico confirmado através da presença de anticorpos anti-HCV no soro (GRETCH, 1997), detecção do RNA viral (ZEUZEM et al., 1994) e genotipagem (STUYVER et al., 1996). Os pacientes esquistossomóticos foram diagnosticados através de ultra-sonografia abdominal e exame parasitológico de fezes [3 amostras seriadas através das técnicas de Hoffman, Pons & Janner e Kato/Katz (REY, 2001)] para caracterizar a doença ativa.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram hepatopatias de outras etiologias e biópsia hepática não interpretável (tamanho insuficiente), HIV positivo/ AIDS, uso de imunossupressores, transplante de fígado, hepatite B e história de alcoolismo. Outras informações relevantes sobre os indivíduos estudados

foram coletadas em fichas de dados clínicos e epidemiológicos (em anexo), obtidas durante a seleção dos mesmos.

Um grupo de 13 de indivíduos sadios dos sexos masculino e feminino e com idade variando entre 21 e 57 anos, funcionários de Serviços Gerais do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), da mesma classe sócio-econômica dos pacientes selecionados, foi utilizado como grupo controle de referência para os testes laboratoriais dos níveis de marcadores biológicos. Por questões éticas, não foram realizadas biópsias hepáticas nesses indivíduos. Além disso, entre os 13 controles selecionados, todos apresentaram 3 exames parasitológicos de fezes negativos para *S. mansoni* e pesquisa de anticorpos anti-HCV negativa.

Todos os pacientes e indivíduos do grupo controle realizaram exames parasitológicos de fezes e além disso, foram coletados 15 ml de sangue para separação do soro para dosagem dos marcadores biológicos não invasivos de fibrose hepática que foram relacionados com os graus de fibrose hepática no nosso estudo. Os marcadores biológicos estudados foram divididos em marcadores bioquímicos e citocinas envolvidas na fibrose e inflamação. Entre os marcadores bioquímicos foram realizadas dosagens de bilirrubinas, transaminases, eletroforese de proteínas, gama- glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina e ácido hialurônico. E as citocinas envolvidas na fibrose e inflamação dosadas foram: TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-13 e TNF- $\alpha$ .

Salientamos que, todos os pacientes e indivíduos do grupo controle só participaram do estudo após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do CPqAM-FIOCRUZ, Recife, 2004 (em anexo).

#### **4.2 Avaliação do grau de fibrose e da atividade inflamatória**

Nosso primeiro objetivo foi a avaliação dos graus de fibrose e atividade inflamatória dos pacientes selecionados e foi alcançado da seguinte maneira: as

biópsias hepáticas fazem parte de um protocolo estabelecido como rotina do Hospital das Clínicas da UFPE para diagnóstico da hepatite C, sendo realizadas através de punção percutânea, após a avaliação de hemograma com contagem de plaquetas e tempo de protrombina. Dois fragmentos foram obtidos, sendo o primeiro colocado em frasco contendo formol e encaminhando para análise histopatológica por patologistas do referido hospital. O segundo fragmento foi colocado em frasco contendo 1ml de Trizol, levado ao CPqAM-FIOCRUZ e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  com a finalidade de, posteriormente extrair o RNA total e avaliar a expressão gênica “*in situ*” de citocinas nesses pacientes.

Os pacientes com indicação de biópsia (pacientes com hepatite C e co-infectados) portanto, realizaram as mesmas independentemente da participação no nosso projeto. Em relação aos pacientes com EHE, as biópsias hepáticas percutâneas foram indicadas apenas quando estes apresentaram elevação de transaminases para esclarecer a presença de outra hepatopatia e também foram realizadas independentemente da participação dos pacientes nesse projeto. A avaliação dos graus de fibrose nesses pacientes foi melhor analisada e realizada através de ultrassonografia.

A avaliação histopatológica do grau de fibrose e atividade inflamatória nas biópsias hepáticas dos pacientes com hepatite C e hepatite C/ esquistossomose, foi realizada de acordo com a classificação METAVIR (METAVIR COOPERATIVE GROUP, 1994; BEDOSSA; POYNARD, 1996). A fibrose foi classificada em 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 histológica, isto é, a medida da intensidade das lesões necroinflamatórias foram classificadas em: A0= sem atividade histológica; A1= atividade histológica leve; A2= atividade histológica moderada; A3= atividade histológica severa.

Além disso, o grau de fibrose dos pacientes com EHE e co-infectados, foi avaliado por exame ultrassonográfico através das classificações do Cairo (WHO, 1990). A classificação do Cairo caracteriza os graus de fibrose em: periportal leve ou Grau I, fibrose periportal moderada ou Grau II e fibrose periportal severa (Fibrose de Symmers) ou Grau III.

Em resumo, os pacientes com hepatite C tiveram os graus de fibrose avaliados através da realização de biópsias hepáticas, os pacientes com EHE

através da ultrassonografia e os pacientes co-infectados realizaram as duas avaliações.

### **4.3 Avaliação dos níveis de marcadores bioquímicos**

Para alcançarmos o segundo objetivo deste trabalho, os marcadores bioquímicos do nosso estudo: bilirrubinas, transaminases ALT e AST, eletroforese de proteínas,  $\gamma$ - glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) e fosfatase alcalina (FA) foram dosados nos soros dos pacientes e indivíduos do grupo controle no laboratório do Hospital das Clínicas de Pernambuco utilizando o aparelho automatizado ARCHITECT C8000 da ABBOTT e reagentes também da ABBOTT. Os valores normais dos marcadores bioquímicos foram: bilirrubina total (até 1,2 mg/dL) e bilirrubina direta (até 0,4 mg/dL); ALT (0 - 42 U/L); AST (0 – 41 U/L); FA (< 105 U/L);  $\gamma$ -GT (15- 60 U/L); proteínas totais (6,4 -8,3 g/dL); albumina (3,4- 5,3 g/dL) e gamaglobulina (0,68- 1,56 g/dL). Enquanto que a dosagem de ácido hialurônico foi realizada no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Paulista de Medicina (UNIFESP) e determinada através de ELISA “sandwich” com marcador fluorescente, cuja sensibilidade foi de 0,2 – 500 ng/ L (KÖPKE-AGUIAR et al., 2002).

### **4.4 Avaliação dos níveis de citocinas**

#### *a) Dosagens de citocinas no soro*

Para alcançarmos o terceiro objetivo do presente estudo, as citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 foram dosadas no soro, através do kit Quantikine R&D systems, seguindo as instruções do fornecedor.

Placas de poliestireno de 96 poços foram pré-sensibilizadas pelo fabricante com anticorpos monoclonais específicos anti-IFN- $\gamma$ , anti-TGF- $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-

13 respectivamente. Os padrões das citocinas foram preparados através da reconstituição das citocinas recombinantes liofilizadas com a adição de água deionizada ou de diluentes apropriados contidos no kit, resultando em soluções estoque de 1000 pg/ml para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ; 2000 pg/ml para TGF- $\beta$ ; e 4000 pg/ml para IL-13 que foram utilizadas como o padrão de maior concentração. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições seriadas com fator 2 em diluente apropriado, sendo o mesmo diluente usado também como o padrão zero (branco). Em seguida, foram adicionados nas placas para dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-13, 100  $\mu$ l/poço do tampão protéico diluente do ensaio e 50  $\mu$ l/poço para TNF- $\alpha$ . Posteriormente foram adicionados 100  $\mu$ l/poço dos soros dos pacientes e controles em duplicata para as dosagens de IFN- $\gamma$ , IL-13 e TNF- $\alpha$  e 200  $\mu$ l/poço dos soros nas placas de dosagem de TGF- $\beta$ . Em seguida, os padrões diluídos para as respectivas citocinas foram adicionados também em duplicata. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 2 horas para as dosagens de IFN- $\gamma$ , IL-13 e TNF- $\alpha$  e por 3 horas para as dosagens de TGF- $\beta$ , sendo posteriormente lavadas com solução tampão por 3 a 4 vezes.

Após essa etapa, foram adicionados 200  $\mu$ l de anticorpos policlonais conjugados à enzima peroxidase, específicos para as respectivas citocinas. As placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 2 horas. Após as lavagens com solução tampão, foram adicionados 200  $\mu$ l/poço da solução de substrato formada por volumes iguais dos reagentes de cor A (peróxido de hidrogênio) e B (tetrametilbenzidina, cromógeno) e as placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois desse período, foram adicionados 50  $\mu$ l/poço da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N para interromper as reações. A intensidade da cor produzida em cada placa foi medida em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 450/595nm. As leituras e os cálculos das concentrações referentes as dosagens das diferentes citocinas foram feitos com o software Microplate Manager, versão 4.0 (Biorad laboratories).

*b) Quantificação relativa de RNAm através de RT-PCR*

O quarto objetivo do presente estudo foi alcançado a partir da extração do RNA total das biópsias hepáticas utilizando um reagente comercial da Invitrogen Life Technologies, o Trizol (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina), seguindo as instruções do fornecedor. O método do Trizol, baseia-se em modificações do método de isolamento de RNA total desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

Cinco etapas foram realizadas utilizando o método do Trizol: 1) Homogeneização: as biópsias hepáticas previamente armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em trizol (1ml trizol para cada 50-100mg de tecido) foram descongeladas e os fragmentos de tecido macerados para lisar as células. 2) Separação das fases: Incubou-se as amostras homogeneizadas por 5 minutos à temperatura ambiente; adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio, mexeu-se os tubos vigorosamente por 15 segundos e incubou-se novamente à temperatura ambiente por 2-3 minutos, e posterior centrifugação a  $12,000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida à centrifugação ocorre a separação das amostras em duas fases: uma fase vermelha, no fundo, fenol-clorofórmio, uma interface e uma fase superior aquosa, incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, sendo o volume da fase aquosa cerca de 60% do volume inicial de Trizol utilizado. 3) Precipitação do RNA: transferiu-se a fase aquosa para um tubo limpo e acrescentou-se 0,5 ml de isopropanol para 1 ml de Trizol usado na homogenização. Incubou-se as amostras a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugou-se a  $12,000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O RNA forma um precipitado branco-amarelado na lateral no fundo do tubo. 4) Lavagem: removeu-se o sobrenadante e o precipitado de RNA foi lavado uma vez com etanol 75% (1 ml etanol/1 ml Trizol). Misturou-se no vórtex e foi realizada a centrifugação a  $7,500 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida removeu-se o etanol do precipitado secar por 5-10 minutos. 5) Redissolvendo o RNA: o precipitado foi redissolvido em água DEPC (água livre de RNAses), cerca de 20  $\mu\text{l}$  de água para cada 20 mg de tecido, passando a solução várias vezes através de pipetagem repetitiva e incubou-se por 10 minutos a  $55-60^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a D.O. 260/280 nm foi determinada (1 mg de RNA mostra D.O. de 1,0 à 260 nm).

As amostras de RNA foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para uso posterior na realização de transcrição reversa e síntese de cDNA.

A transcrição reversa do RNA total foi realizada baseada no protocolo de WYNN et al (1993) com modificações. Para um volume final de 50  $\mu\text{l}$  de reação, segue brevemente: 5  $\mu\text{l}$  do tampão de amplificação para transcrição reversa 10 x (50 mM Tris-HCl, pH= 8,3, 75 mM KCl, 3mM  $\text{MgCl}_2$ ); 5  $\mu\text{l}$  de 2 mM mix de 4dNTP; 0,5 U de hexâmeros randômicos (Pharmacia Biotech); 25 U de RNAsin (Promega); 500 U de transcriptase reversa M-MLV (Promega); 5  $\mu\text{l}$  de RNA total e completar o volume final com água DEPC. A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Colocou-se rapidamente a solução no gelo por 5 minutos e armazenou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Finalizadas as etapas de isolamento de RNA total e transcrição reversa com síntese de cDNA, seguimos para a terceira etapa que foi a reação de PCR em Tempo Real, na qual realizamos a quantificação relativa de RNAm codificando IL-13 e IFN- $\gamma$  normalizados com o RNAr 18s, que foi nosso controle endógeno da reação.

Utilizamos primers e sondas Taq-man fornecidas pela Applied Biosystems, Inc, para assim avaliar a expressão gênica dessas citocinas e do controle endógeno, marcadas com diferentes corantes fluorescentes (FAM e VIC, respectivamente), o que possibilitou a realização de multiplex PCR segundo as instruções do fornecedor.

Para um volume final de 50  $\mu\text{l}$  de reação, segue: 2,5  $\mu\text{l}$  de primers e sondas do controle endógeno; 2,5  $\mu\text{l}$  de primers e sondas para detecção do cDNA alvo das citocinas IL-13 ou IFN- $\gamma$ ; 5  $\mu\text{l}$  do cDNA da amostra; 25 $\mu\text{l}$  do master mix (2x concentrado); 15  $\mu\text{l}$  de água mili-Q autoclavada. Além disso, foram incluídos nas placas de reação, dois controles negativos (sem o cDNA alvo) e uma amostra calibradora escolhida previamente e que foi utilizada como uma amostra comparativa com as outras amostras testes.

#### **4.5 Análise estatística e desenho do estudo**

Para alcançarmos o quinto objetivo do presente estudo, a análise estatística dos resultados foi realizada da seguinte maneira: os pacientes com hepatite C e co-

infectados foram divididos dentro de cada grupo em 2 categorias de acordo com o grau das lesões histológicas: 1) sem fibrose significativa ou leve (F0 e F1) e 2) com fibrose clinicamente significativa ou severa (F2, F3 e F4) de acordo com a classificação METAVIR considerando que o estágio de fibrose F2 é geralmente escolhido como o ponto de corte para iniciar o tratamento anti-viral da infecção crônica pelo HCV (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 1999). Os pacientes foram também subgrupados de acordo com o grau de atividade necroinflamatória em: 1) sem atividade ou pouca atividade (A0 e A1) e 2) com atividade substancial (A2 e A3).

Os pacientes com EHE e co-infectados foram categorizados em Grau I, II ou III de fibrose periportal através de ultrassonografia e foram analisados em função dos níveis dos marcadores bioquímicos para fibrose.

O presente estudo tem o desenho caso-controle, em que foi definido como “caso” a condição de maior gravidade, com particular interesse nos graus de fibrose (F2, F3 e F4). Por outro lado, as situações com patologia leve foram definidas como “controle” (F0 ou F1). A situação que foi analisada por modelo logístico multivariado foi principalmente os graus de fibrose. Porém, em paralelo, foi analisada a atividade inflamatória. As variáveis independentes ou explicativas foram os níveis de marcadores bioquímicos e citocinas.

Foram utilizados para avaliação estatística ANOVA e curvas ROC.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de cada marcador que apresentou diferença estatística com os graus de fibrose e/ou atividade inflamatória também foram calculadas.

## 5 RESULTADOS

Os 79 pacientes selecionados para o nosso estudo portadores de hepatite C, hepatite C/EHE e EHE e os 13 indivíduos do grupo controle não apresentaram diferenças estatísticas em relação à idade e sexo, havendo um maior número de indivíduos do sexo feminino nos pacientes com hepatite C e grupo controle como pode ser observado na Tabela 1.

Em relação ao genótipo viral, notamos uma maior prevalência da infecção pelo HCV do genótipo 1b, tanto nos pacientes com a monoinfecção pela hepatite C (54,1%) como nos co-infectados (57,9%), não havendo diferença estatística ao compararmos esses grupos de pacientes.

**Tabela 1: Características demográficas dos indivíduos estudados**

Características		Pacientes			Controle
		Hepatite C	Hepatite C/ EHE	EHE	
N		37	19	23	13
Idade* (anos)		47,00 ± 9,59	51,16 ± 10,64	49,43 ± 11,05	33,92 ± 9,47
Sexo	M	16	10	13	5
	F	21	9	10	8
Genótipo Viral N (%)	1 a	5 (13,5)	-	-	-
	1 b	20 (54,1)	11 (57,9)	-	-
	2 a	1 (2,7)	-	-	-
	2 b	-	1 (5,3)	-	-
	3 a	10 (27,0)	5 (26,3)	-	-
	ND	1 (2,7)	2 (10,5)	-	-

N- Número de indivíduos estudados; M- Masculino; F- Feminino; ND- Não determinado; EHE- Esquistossomose hepatoesplênica; \* Idade expressa em Média ± Desvio Padrão. – Não realizado

Com o objetivo de determinarmos os graus de fibrose nos pacientes estudados realizamos ultrassonografia dos pacientes com EHE e pacientes com hepatite C/EHE, onde identificamos a fibrose através da classificação do Cairo. Para analisarmos a histopatologia das biópsias hepáticas dos pacientes com hepatite C e hepatite C/EHE utilizamos a classificação METAVIR para avaliarmos os graus de fibrose e grau de atividade necro-inflamatória hepática.

A maioria dos pacientes com hepatite C apresentaram grau de fibrose F1 e atividade inflamatória A1, sendo consideradas uma fibrose leve e uma atividade inflamatória também leve ou não significativa clinicamente.

Ao compararmos os graus de fibrose F2, F3 e F4 nos pacientes com hepatite C e co-infectados, observamos que o número de pacientes com fibrose severa foi proporcional entre os dois grupos, sugerindo que a associação das duas doenças não pareceu contribuir para aumentar a gravidade da fibrose na co-infecção.

Em relação aos pacientes com EHE e co-infectados, o exame ultrasonográfico classificou a fibrose em Grau II na maioria dos casos, sugerindo que a co-infecção também não contribuiu para a progressão da fibrose (Tabela 2).

**Tabela 2: Número de pacientes classificados de acordo com o exame histológico (Classificação METAVIR) e ultra-sonografia (Classificação do Cairo)**

Exame			Pacientes		
			Hepatite C (n=34)	Hepatite C/ EHE (n=16)	EHE (n=23)
Histológico	Fibrose (%)	F0	3 (8,8)	0 (0)	-
		F1	12 (35,2)	5 (31,2)	-
		F2	9 (26,4)	5 (31,2)	-
		F3	9 (26,4)	5 (31,2)	-
		F4	1 (2,9)	1 (6,25)	-
	Atividade Inflamatória (%)	A0	1 (2,9)	0 (0)	-
		A1	16 (47,0)	5 (31,2)	-
		A2	13 (38,2)	8 (50,0)	-
Ultra-sonografia	Fibrose (%)	A3	4 (11,7)	3 (18,7)	-
		GI	-	5 (31,2)	2 (8,6)
		GII	-	7 (43,7)	16 (69,5)
		GIII	-	2 (12,5)	5 (21,7)

EHE – Esquistossomose hepatoesplênica; F0 – sem fibrose; F1 – fibrose portal sem septos; F2 – fibrose portal com poucos septos; F3 – fibrose portal com numerosos septos sem cirrose; F4 – cirrose; A0 – sem atividade; A1 – atividade leve; A2 – atividade moderada; A3 – atividade severa; GI – fibrose periportal leve; GII – fibrose periportal moderada; GIII – fibrose periportal severa; – Não realizado.

O “n” reduzido para 34 nos pacientes com hepatite C e para 16 nos co-infectados foi em consequência das amostras das biópsias hepáticas analisadas terem sido insuficientes ou inconclusivas. Em relação também aos indivíduos co-infectados, 2 pacientes não realizaram a ultra-sonografia.

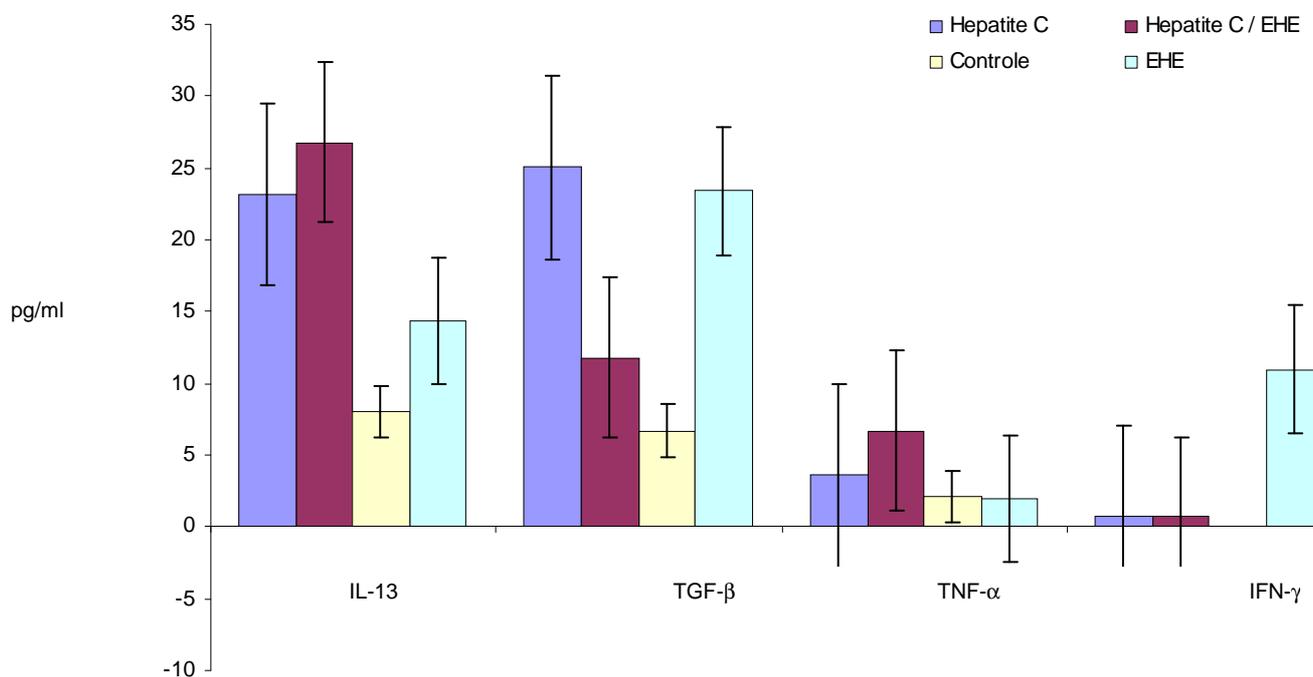
De maneira a organizar e para que possamos relatar adequadamente nossos resultados, estes foram divididos em 4 seções descritas nos itens que seguem abaixo:

### **5.1 Relação entre níveis de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C, hepatite C/EHE, EHE e grupo controle.**

Determinamos os níveis séricos dos marcadores bioquímicos (bilirrubinas, eletroforese de proteínas, transaminases, gama- glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), fosfatase alcalina e ácido hialurônico), assim como os níveis séricos das citocinas TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 e comparamos os valores encontrados entre os 4 grupos selecionados.

Não se encontrou diferenças estatísticas nos níveis séricos das citocinas TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 entre os 4 grupos estudados (Figura 3).

Além disso, avaliamos a quantificação relativa do RNAm das citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$  nas biópsias hepáticas dos pacientes com hepatite C e co-infectados, entretanto não encontramos nenhuma diferença estatística nesses grupos (dados não mostrados).



**Figura 3. Níveis séricos das citocinas IL-13, TGF-β, TNF-α e IFN-γ em pacientes com hepatite C (n = 37), hepatite C/ EHE (n = 19), EHE (n = 11) e grupo controle (n = 8). Os resultados estão como média e erro padrão da média.**

Em relação ao número de plaquetas (gráfico não mostrado), encontramos níveis menores em pacientes com EHE em relação aos pacientes com hepatite C ( $p = 0,042$ ).

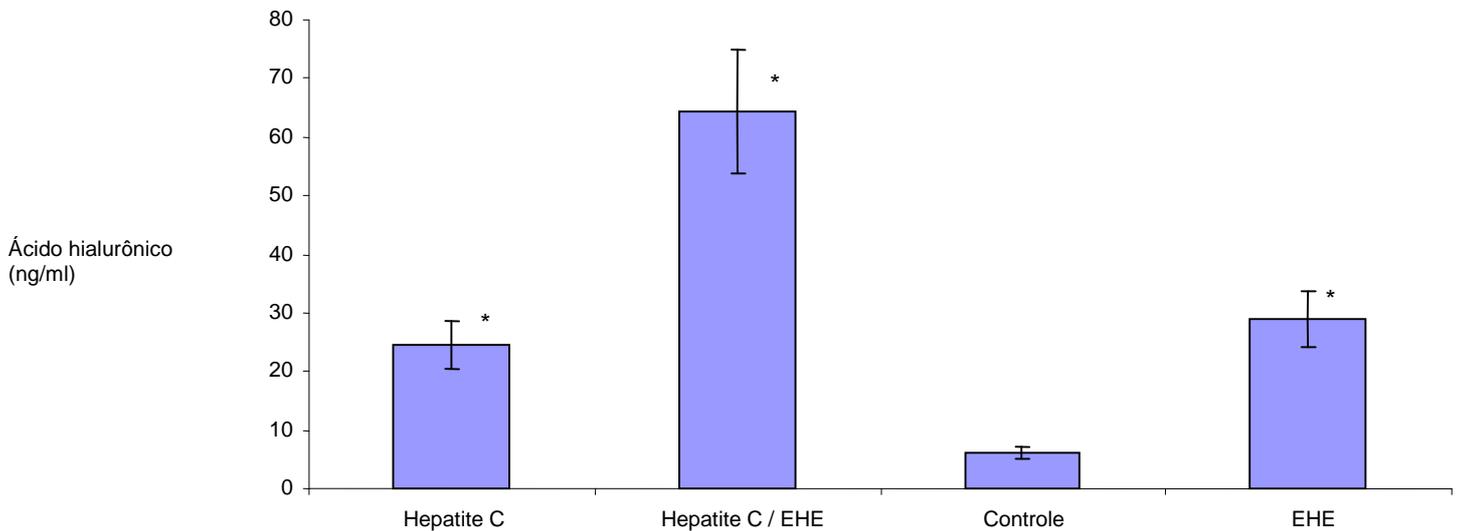
Entre os marcadores bioquímicos para fibrose hepática analisados, observamos níveis mais elevados de ácido hialurônico ( $p = 0,001$ ); ALT ( $p < 0,001$ ) e AST ( $p = 0,005$ ); fosfatase alcalina ( $p = 0,007$ );  $\gamma$ -GT ( $p = 0,002$ ); bilirrubinas total, direta ( $p < 0,001$ ) e indireta ( $p = 0,004$ ); albumina ( $p = 0,001$ ) e gamaglobulina ( $p < 0,001$ ) nos três grupos de pacientes comparados ao grupo controle (Figura 4, 5, 6 e 7).

Destacamos ainda diferenças estatisticamente significantes encontradas entre os grupos de pacientes nas dosagens de ALT, onde pacientes com hepatite C apresentaram níveis mais elevados que os pacientes com EHE ( $p < 0,001$ ) e níveis

de AST no grupo co-infectado também maiores em relação ao grupo com EHE ( $p = 0,005$ ; Figura 5).

Além disso, encontramos níveis de bilirrubinas total e direta maiores nos pacientes co-infectados em comparação aos pacientes com hepatite C ( $p < 0,001$ ; Figura 6).

E, por fim, foi observado que a relação AST/ALT foi mais elevada também nos pacientes co-infectados em relação aos pacientes com hepatite C e EHE apenas ( $p < 0,001$ , figura não mostrada).



**Figura 4.** Níveis séricos de ácido hialurônico (ng/ml) em pacientes com hepatite C (n= 37), hepatite C/EHE (n= 19), EHE (n=23) e grupo controle (n= 13). Os resultados estão como média e erro padrão da média. \* Indica  $p < 0,05$  nos 3 grupos de pacientes comparados ao controle.

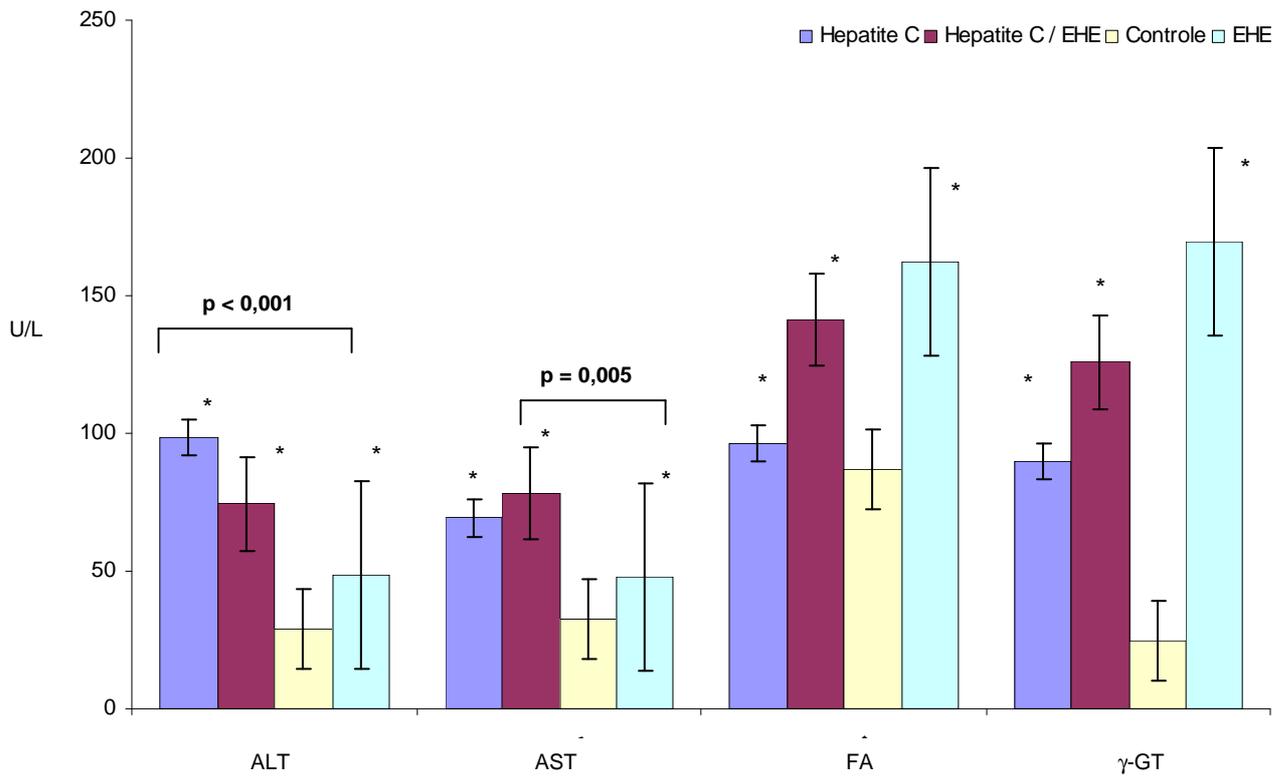


Figura 5. Níveis séricos de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) em pacientes com hepatite C (n = 37), hepatite C/ EHE (n = 19), EHE (n = 11) e grupo controle (n = 13). Os resultados estão como média e erro padrão da média. \* Indica  $p < 0,05$  nos 3 grupos de pacientes comparados ao controle.

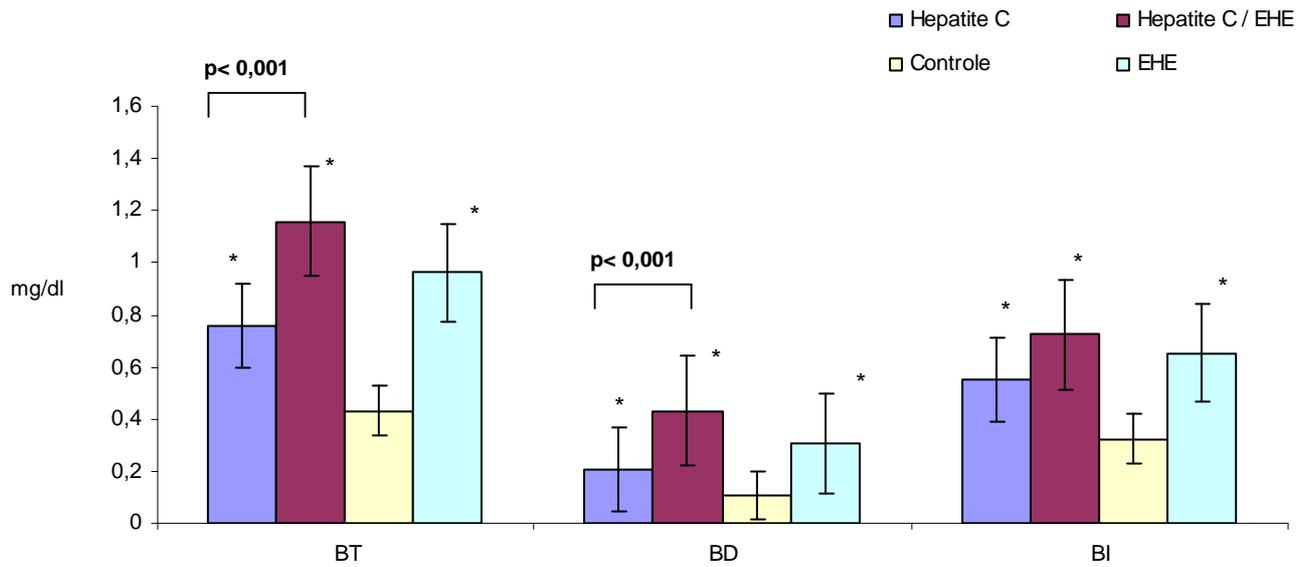


Figura 6. Níveis séricos de Bilirrubinas Total (BT), direta (BD) e indireta (BI) em pacientes com hepatite C (n = 37), hepatite C/ EHE (n = 19), EHE (n = 11) e grupo controle (n = 13). Os resultados estão como média e erro padrão da média. \* Indica  $p < 0,05$  nos 3 grupos de pacientes comparados ao controle.

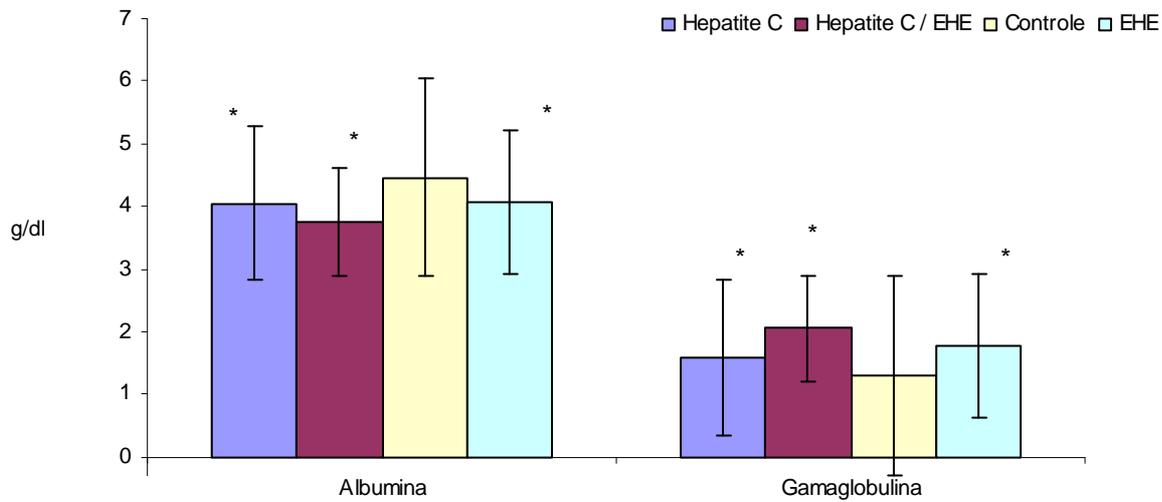


Figura 7. Níveis séricos de albumina e gamaglobulina em pacientes com hepatite C (n = 37), hepatite C/ EHE (n = 19), EHE (n = 11) e grupo controle (n =13). Os resultados estão como média e erro padrão da média. \* Indica  $p < 0,05$  nos 3 grupos de pacientes comparados ao controle.

## 5.2 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose e atividade inflamatória em pacientes com hepatite C

A avaliação histológica dos graus de fibrose através da classificação METAVIR foi dividida na Tabela 3 em fibrose não significativa ou leve (F0, F1) e fibrose significativa ou severa (F2, F3, F4). Ao compararmos os níveis dos marcadores biológicos em relação aos graus de fibrose demonstramos que TNF- $\alpha$  ( $p= 0,010$ ), ácido hialurônico ( $p= 0,036$ ), AST ( $p= 0,019$ ), FA ( $p= 0,004$ ) e gamaglobulina ( $p= 0,037$ ) diferenciaram os pacientes com hepatite C entre fibrose leve e severa (tabela 5), sendo importantes marcadores para avaliar grau de fibrose e decisão de tratamento, visto que a partir do grau F2 é que se indica tratamento anti-viral nos pacientes com hepatite C.

**Tabela 3. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de fibrose em pacientes com hepatite C**

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>p-valor</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
Fibrose não significativa	15	1,322	3,182	<b>0,010</b>
Fibrose significativa	19	5,906	6,260	
<b>Ácido hialurônico</b>				
Fibrose não significativa	15	11,787	8,403	<b>0,036</b>
Fibrose significativa	19	33,958	41,809	
<b>AST</b>				
Fibrose não significativa	15	48,733	21,191	<b>0,019</b>
Fibrose significativa	19	82,842	54,179	
<b>FA</b>				
Fibrose não significativa	15	72,133	15,431	<b>0,004</b>
Fibrose significativa	19	114,737	53,992	
<b>Gamaglobulina</b>				
Fibrose não significativa	15	1,473	0,171	<b>0,037</b>
Fibrose Significante	19	1,672	0,346	

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alpha; ALT- Alanina amino transferase; AST- Aspartato amino transferase; FA- Fosfatase alcalina. Fibrose não significativa ou leve = F0, F1; Fibrose significativa ou severa = F2, F3, F4. DP = Desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Avaliamos os graus de atividade inflamatória nas biópsias hepáticas de pacientes com HCV através da classificação METAVIR e dividimos a inflamação em atividade clinicamente não significativa ou leve (A0, A1) e significativa ou severa (A2, A3) e comparamos com os níveis de marcadores biológicos.

Níveis elevados dos marcadores ALT ( $p = 0,013$ ), AST ( $p = 0,030$ ), FA ( $p = 0,021$ ),  $\gamma$ GT ( $p = 0,010$ ) e a relação AST/plaquetas ( $p = 0,003$ ) se relacionaram com atividade inflamatória severa em pacientes com hepatite C, diferenciando-os daqueles com inflamação leve (Tabela 4).

**Tabela 4. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C.**

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>p-valor</b>
<b>ALT</b>				
Atividade não significante	18	74,333	37,376	<b>0,013</b>
Atividade significativa	16	116,938	55,947	
<b>AST</b>				
Atividade não significante	18	52,000	41,042	<b>0,030</b>
Atividade significativa	16	85,563	45,239	
<b>FA</b>				
Atividade não significante	18	78,944	28,678	<b>0,021</b>
Atividade significativa	16	115,063	55,371	
<b>γGT</b>				
Atividade não significante	18	63,722	43,823	<b>0,010</b>
Atividade significativa	16	114,250	62,505	
<b>AST / PLAQUETAS</b>				
Atividade não significante	15	0,00023	0,00009	<b>0,003</b>
Atividade significativa	19	0,00050	0,00034	

ALT- Alanina amino transferase; AST- Aspartato amino transferase; FA- Fosfatase alcalina; GGT- Gamma Glutamil transferase. Atividade inflamatória não significativa ou leve= A0, A1; Atividade inflamatória significativa ou severa= A2, A3. DP = Desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Investigamos ainda nos pacientes com hepatite C, a relação entre grau de fibrose e atividade inflamatória com a faixa etária e sexo e observamos maior severidade da fibrose e inflamação naqueles indivíduos com mais de 40 anos. Entretanto, não observamos diferenças em relação entre os sexos masculino e feminino com os graus de fibrose e inflamação (Tabela 5).

**Tabela 5. Relação entre idade e sexo com graus de fibrose e atividade inflamatória nos pacientes com hepatite C.**

<b>HEPATITE C</b>					
<b>Características Específicas</b>	<b>Fibrose</b>				<b>p-valor</b>
	<b>N</b>	<b>Leve</b> <b>%</b>	<b>N</b>	<b>Severa</b> <b>%</b>	
<b>Sexo</b>					
Masculino	9	50,00	9	50,00	0,464
Feminino	6	37,50	10	62,50	
<b>Idade (anos)</b>					
< 40	7	77,78	2	22,22	<b>0,025</b>
> 41	8	32,00	17	68,00	
<b>Atividade Inflamatória</b>					
					<b>p-valor</b>
	<b>N</b>	<b>Leve</b> <b>%</b>	<b>N</b>	<b>Severa</b> <b>%</b>	
<b>Sexo</b>					
Masculino	11	61,11	7	38,89	0,311
Feminino	7	43,75	9	56,25	
<b>Idade (anos)</b>					
< 40	8	88,89	1	11,11	<b>0,019</b>
> 41	10	40,00	15	60,00	

N = número de pacientes;  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Por fim, nos pacientes com hepatite C observamos a correlação entre os níveis séricos de IL-13 e RNAm de IL-13 nas biópsias hepáticas ( $p = 0,038$ ).

### **5.3 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose e atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/ EHE**

Da mesma maneira que o grupo de pacientes com hepatite C, dividimos os graus de fibrose avaliados no exame histológico através da classificação METAVIR em fibrose significativa e não significativa e não encontramos diferença estatística em relação a nenhum dos marcadores biológicos nos pacientes com hepatite C/EHE.

No entanto, quando analisamos diferentemente os graus de atividade inflamatória dividindo-os agora em 3 grupos: A0, A1; A2; e A3 separadamente, tanto

a ALT ( $p < 0,001$ ) como AST ( $p = 0,001$ ) diferenciou A0, A1 de A3 e A2 de A3 (Tabela 6).

**Tabela 6. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/EHE**

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>p-valor</b>	
<b>ALT</b>					
A0, A1	5	48,000	16,047	<b>&lt; 0001</b>	A0, A1 x A3
A2	8	68,250	21,933		A2 x A3
A3	3	152,333	45,982		
<b>AST</b>					
A0, A1	5	56,000	23,452	<b>0,001</b>	A0, A1 x A3
A2	8	73,500	24,119		A2 x A3
A3	3	141,000	10,149		

ALT- Alanina amino transferase; AST- Aspartato amino transferase; N = número de pacientes; DP = Desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

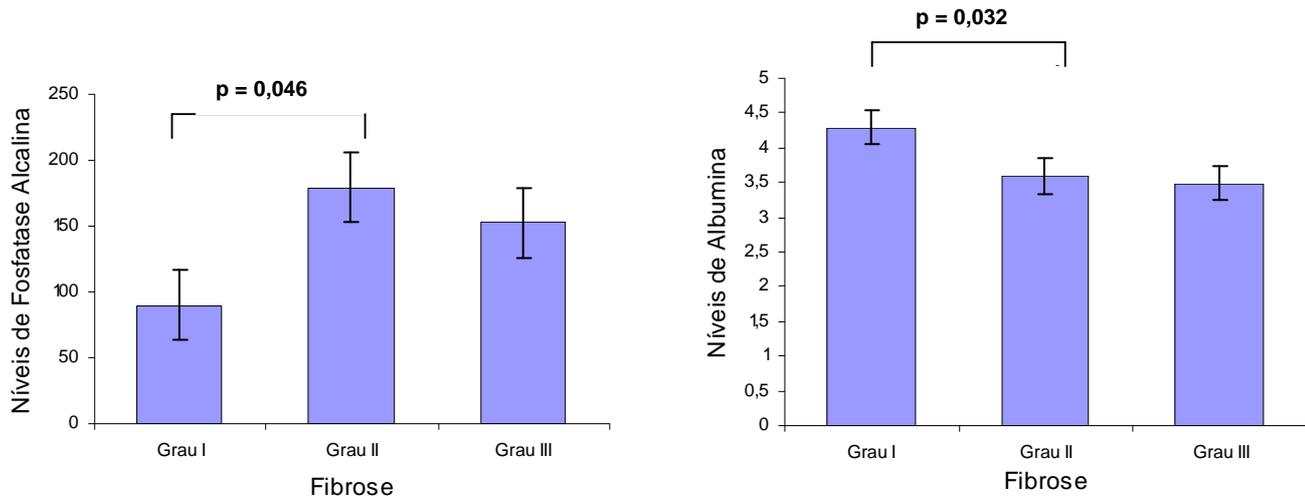
Ainda em relação com a atividade inflamatória, ao compararmos atividade não significativa e significativa com os níveis dos marcadores biológicos nos pacientes co-infectados foi observado que os níveis elevados de ácido hialurônico ( $p = 0,011$ ) e gamaglobulinas ( $p = 0,013$ ) se relacionaram com atividade inflamatória severa. Ao contrário, o número de plaquetas ( $p = 0,005$ ) se apresentou mais elevado associado à inflamação leve (Tabela 7).

**Tabela 7. Relação entre níveis de marcadores biológicos com os graus de atividade inflamatória em pacientes com hepatite C/EHE**

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>p-valor</b>
<b>Plaquetas</b>				
Atividade não significativa	5	218800,000	37996,052	<b>0,005</b>
Atividade significativa	11	142909,091	43700,010	
<b>Ácido hialurônico</b>				
Atividade não significativa	5	11,280	5,669	<b>0,011</b>
Atividade significativa	11	85,745	78,802	
<b>Gamaglobulina</b>				
Atividade não significativa	5	1,530	0,145	<b>0,013</b>
Atividade significativa	11	2,348	0,890	

Atividade inflamatória não significativa ou leve= A0, A1; Atividade inflamatória significativa ou severa= A2, A3. N = número de pacientes. DP = Desvio padrão.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

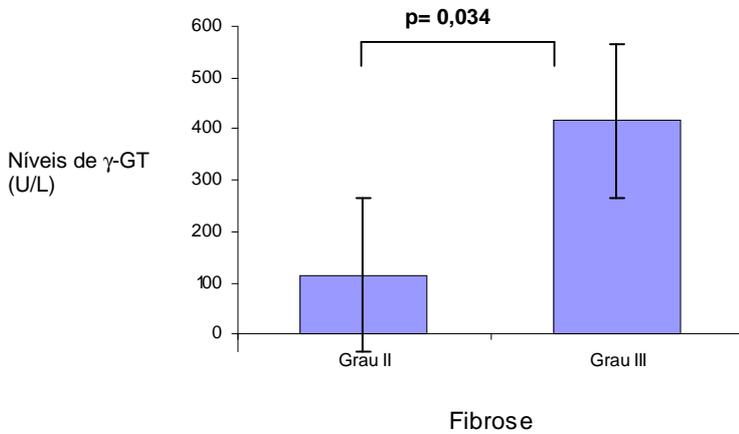
Os pacientes co-infectados também tiveram os graus de fibrose determinados através de exame ultra-sonográfico utilizando a classificação do Cairo. Comparamos os graus de fibrose em relação aos níveis de marcadores biológicos e apenas a FA ( $p = 0,046$ ) e a albumina ( $p = 0,032$ ) foram capazes de diferenciar entre os graus de fibrose I e II nesses pacientes.



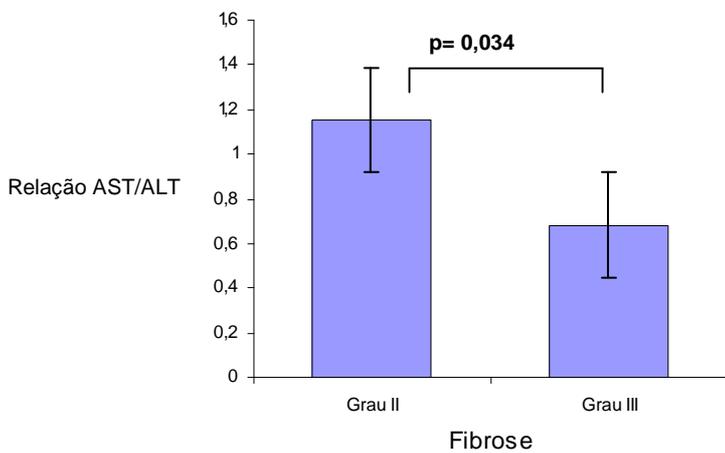
**Figura 8. Níveis séricos de fosfatase alcalina (U/L) e albumina (g/dL) em pacientes com hepatite C/ EHE. A barra vertical indica o erro padrão da média (EPM).  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Grau I (n = 5), grau II (n = 7) e grau III (n = 2).**

#### **5.4 Relação entre níveis de marcadores biológicos com graus de fibrose em pacientes com EHE**

Ao analisarmos os níveis de marcadores biológicos com relação aos graus de fibrose obtidos pela ultrassonografia dos pacientes com EHE, demonstramos que apenas a  $\gamma$ -GT ( $p = 0,034$ ) e a relação AST/ALT ( $p = 0,034$ ) diferenciou esses pacientes em grau II e III.



**Figura 9.** Níveis séricos de  $\gamma$ - glutamil transferase ( $\gamma$ GT) em pacientes com EHE. Os resultados estão como média e erro padrão da média.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Grau II (n = 9) e grau III (n = 2).



**Figura 10.** Relação AST/ALT e graus de fibrose através de USG utilizando a classificação do Cairo em pacientes com EHE. A Os resultados estão como média e erro padrão da média.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Grau II (n= 9) e grau III (n= 2).

Analizamos posteriormente em pacientes com hepatite C as curvas ROC, com melhores valores de “cut-off”, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos marcadores que tiveram diferença estatística significativa como preditores de fibrose leve e severa e também de atividade necroinflamatória leve ou severa. Não foi possível, entretanto, analisar curvas ROC dos pacientes co-infectados e com EHE devido ao menor número da amostra.

Em relação aos graus de fibrose os marcadores com maiores sensibilidades e especificidades e que poderiam ser usados para diferenciar entre fibrose leve e severa foram: TNF- $\alpha$  com sensibilidade de até 63,1% e especificidade de 86,6% ;ácido hialurônico com sensibilidade de até 84,2% e especificidade de 66,6% e fosfatase alcalina com sensibilidade de até 73,6% e especificidade de 93,3,7% (Tabela 8).

**Tabela 8: Níveis séricos de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C em relação aos graus de fibrose leve (F0, F1) ou severa (F2, F3, F4).**

<i>Marcador</i>	<i>“Cut-off”</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>	<i>p-valor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	2,81	63,16%	86,67%	85,71%	65,00%	0,003
<b>Ácido hialurônico</b>	11,90	84,21%	66,67%	76,19%	76,92%	0,002
<b>FA</b>	89,00	73,68%	93,33%	93,33%	73,68%	<0,001
<b>AST</b>	59,50	57,14%	86,67%	83,33%	59,09%	0,017
<b>Gamaglobulina</b>	1,77	52,63%	100,00%	100,00%	62,50%	0,001
<b>AST/plaquetas</b>	0,000364	57,89%	93,33%	91,67%	63,64%	0,002

VPP- Valor preditivo positivo, VPN- Valor preditivo negativo e  $p < 0,05$  foi considerado significativo. O intervalo de confiança considerado foi de 95%.

Em relação à atividade inflamatória os marcadores com maiores sensibilidades e especificidades e que poderiam ser usados para diferenciar entre atividade leve e severa foram: ALT com sensibilidade de 68,7% e especificidade de

88,8%; AST com sensibilidade de até 62,5% e especificidade de 88,8%; FA com sensibilidade de 56,25 % e especificidade de 94,44% (Tabelas 9).

**Tabela 9. Níveis séricos de marcadores biológicos em pacientes com hepatite C em relação aos graus de atividade inflamatória leve (A0, A1) e severa (A2, A3).**

<i>Marcador</i>	<i>“Cut-off”</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>	<i>p-valor</i>
<b>ALT</b>	96,50	68,75%	88,89%	84,62%	76,19%	0,001
<b>ÁST</b>	59,50	62,50%	88,89%	83,33%	72,73%	0,002
<b>FA</b>	104,00	56,25%	94,44%	90,00%	70,83%	0,002
<b>γ-GT</b>	71,50	68,75%	77,78%	73,33%	73,68%	0,006
<b>AST/plaquetas</b>	0,00028	75,00%	77,78%	75,00%	77,78%	0,002

VPP- Valor preditivo positivo, VPN- Valor preditivo negativo e  $p < 0,05$  foi considerado significativo. O intervalo de confiança considerado foi de 95%.

## 6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, buscamos avaliar marcadores biológicos que pudessem ser utilizados para previsão de gravidade de fibrose hepática na hepatite C, esquistossomose e co-infecção hepatite C/ esquistossomose, considerando a hipótese de que níveis elevados de marcadores biológicos, incluindo marcadores bioquímicos e citocinas pró-fibróticas estariam associados com a severidade da fibrose hepática nessas doenças.

A morbidade e mortalidade na hepatite C e na esquistossomose estão relacionadas com a fibrose hepática e conseqüências decorrentes do processo fibrogênico. Na esquistossomose, a fibrose é decorrente de uma resposta imune granulomatosa ao redor dos ovos do parasita localizados principalmente no fígado, podendo levar a hipertensão portal e óbito por sangramento digestivo alto (RIBEIRO DE JESUS et al., 2004; ABATH et al., 2006). Na hepatite C, uma resposta imune ineficiente para eliminar o vírus vai gerar a fibrose que pode levar a cirrose, insuficiência hepática e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; MYERS et al., 2002; KAMAL et al., 2006).

Portanto, a avaliação da severidade da fibrose hepática é de extrema importância na determinação de estratégias de tratamento, além de orientar no prognóstico e risco de complicações em pacientes com doenças hepáticas crônicas. A biópsia hepática é o padrão-ouro para avaliar estágio/ severidade da fibrose hepática, porém é um procedimento invasivo, com riscos de sangramento e dor, além de apresentar erros de amostragem e alto custo (LICHTINGHAGEN; BAHR, 2004).

Devido a essas limitações, muito esforço tem sido investido para identificar marcadores biológicos séricos preditores de fibrose com o objetivo de substituir as biópsias hepáticas. Um teste ideal não invasivo para avaliar a fibrose hepática deve ser: simples, rápido e não ter um custo elevado. Nesse sentido o presente estudo avaliou as dosagens de marcadores bioquímicos: plaquetas, ALT, AST, fosfatase alcalina,  $\gamma$ -glutamil transferase, bilirrubinas, eletroforese de proteínas e ácido hialurônico além de citocinas envolvidas na fibrogênese e inflamação: IL-13, TGF- $\beta$ ,

IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  , todos eles em relação aos graus de fibrose obtidos através da histopatologia das biópsias hepáticas e ultrasonografia.

A progressão da fibrose na hepatite C é extremamente variável, e a história natural da doença pode durar décadas. Em vários estudos sobre hepatite C crônica, foi demonstrado que fatores como idade, duração da infecção, uso de álcool, sexo masculino e co-infecção com HIV, hepatite B e esquistossomose têm sido relacionados com um maior risco de progressão para fibrose e atividade inflamatória severas. Entretanto, não existem muitas evidências de que fatores virais como genótipo e carga viral influenciem a progressão da fibrose, mas são importantes na avaliação da duração e resposta ao tratamento (COSTA et al., 2002; FREEMAN et al., 2003; POYNARD et al., 2003; KAMAL et al., 2004; KAMAL et al., 2006).

O HCV possui 6 genótipos e observamos em nossos resultados que houve uma maior prevalência do genótipo 1b nos pacientes com hepatite C e co-infectados, sendo o genótipo 1b associado a pior resposta terapêutica (BENVEGNÚ et al., 1997).

Além disso, em relação aos fatores relacionados com a progressão da fibrose como sexo masculino e idade, não observamos diferença estatística ao compararmos sexo masculino e feminino em relação à presença de fibrose e atividade inflamatória severa. Porém, naqueles pacientes com idade maior que 40 anos, observamos maior presença de fibrose ( $p = 0,025$ ) e atividade inflamatória ( $p = 0,019$ ) severa em comparação àqueles com idade menor que 40 anos. Concordando com os estudos que demonstraram que pacientes infectados pertencentes a uma maior faixa etária, adquirem um maior grau de inflamação hepática e com isso tem um maior desenvolvimento da fibrose, evoluindo para o grau de cirrose em um menor período de tempo (FREEMAN et al., 2003)

Autores como Kamal et al. (2000, 2001, 2004, 2006) e El- Kady et al. (2004) demonstraram que a co-infecção exibe um padrão clínico, virológico e histológico único, caracterizado por alta taxa de RNA viral, baixa resposta ao tratamento antiviral e alta taxa de progressão de fibrose. Outros estudos mostraram que a esquistossomose pode atuar contra-regulando os efeitos estimulatórios do vírus C sobre citocinas Th1, podendo levar a cronicidade da hepatite C em pacientes co-infectados (EL KADY et al., 2004), mostrando que a taxa de progressão da fibrose

hepática é mais rápida nos pacientes co-infectados do que naqueles apenas com hepatite C (KAMAL et al. 2000, 2004; ANGÉLICO et al., 1997).

Entretanto, nos pacientes co-infectados avaliados nesse estudo, a associação das duas doenças não pareceu ter contribuído para aumentar a gravidade da fibrose, visto que ao comparamos os graus de fibrose F2, F3 e F4 com os pacientes com hepatite C apenas, o número de pacientes com fibrose severa foi proporcional entre os dois grupos. O mesmo foi demonstrado nos pacientes com EHE e co-infectados, onde o exame ultra-sonográfico classificou a fibrose em Grau II na maioria dos casos, sugerindo que a co-infecção também não contribuiu para a progressão da fibrose na esquistossomose. Esses achados concordaram com Gad et al. (2001) e Shiha e Zalata (2002) que demonstraram os níveis de carga viral e ALT mais baixos nos pacientes co-infectados e que a esquistossomose não leva à progressão da fibrose em pacientes com hepatite C.

Essa falta de sinergismo das doenças contribuindo para a progressão da fibrose hepática, pode ser explicada pela ausência de co-fatores importantes nos pacientes desse estudo, como: infecção pelo HIV, consumo de álcool ou infecção pelo vírus da hepatite B, todos eles caso estivessem presentes estimulariam a progressão da fibrose hepática.

É interessante salientar que a não visualização no nosso estudo, de significância estatística do sinergismo das duas doenças para uma progressão a fibrose hepática mais severa pode também não ter sido observada devido ao pequeno número de indivíduos estudados, já que alguns marcadores bioquímicos apresentaram seus níveis mais elevados na co-infecção quando comparados a hepatite C e esquistossomose sozinhas e podem estar indicando a severidade da fibrose na associação das duas doenças.

Além disso, na hepatite C, a maioria dos pacientes apresentaram grau de fibrose F1 e atividade inflamatória A1, sendo consideradas fibrose e atividade inflamatória leve ou não significativa clinicamente. Esse achado está de acordo com trabalhos já publicados (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; KAMAL et al., 2004, 2006) em que se demonstrou que a hepatite C é uma doença de evolução lenta, onde a taxa de progressão da fibrose na hepatite C é de 0,1 unidades por ano e desenvolvimento de cirrose num período de 20-40 anos, quando comparada com a

taxa de 0,61 unidades por ano na co-infecção e desenvolvimento de cirrose dentro de 10 anos.

Em relação aos níveis séricos das citocinas TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 envolvidas na fibrogenese, não encontramos diferenças estatísticas nos 3 grupos de pacientes estudados e grupo controle, como também não observamos diferença estatística nos níveis RNAm das citocinas IL-13 e IFN- $\gamma$  nas biópsias hepáticas dos pacientes com hepatite C e co-infectados. No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  foram maiores no grupo dos pacientes co-infectados, sugerindo que esses pacientes podem ter a infecção esquistossomótica facilitando um maior nível de inflamação hepática (KAMAL et al., 2006). Por outro lado, o nível de TGF- $\beta$ , citocina considerada pró-fibrótica, foi mais baixo no grupo co-infectado comparado com os outros grupos de pacientes. Entretanto, essa citocina torna-se mais elevada após 2 anos de progressão da doença (KAMAL et al., 2006) e como nesse estudo, o início das doenças não pôde ser bem delimitado, o grupo de co-infectados pode ainda estar na fase inicial.

Entretanto, observamos menor número de plaquetas em pacientes com EHE em relação aos pacientes com hepatite C ( $p = 0,042$ ), provavelmente isso se deve ao fato de que na forma hepatoesplênica da esquistossomose há um maior seqüestro das células sanguíneas pelo baço devido ao hiperesplenismo e como consequência ocorre uma pancitopenia, onde a trombocitopenia pode ser usada como importante marcador biológico de hipertensão portal (SOUZA; TOLEDO; BORGES, 2000).

Entre os marcadores bioquímicos para fibrose hepática analisados, observamos níveis mais elevados de ácido hialurônico ( $p=0,001$ ); ALT ( $p < 0,001$ ) e AST ( $p = 0,005$ ); fosfatase alcalina ( $p = 0,007$ );  $\gamma$ -GT ( $p = 0,002$ ); bilirrubinas ( $p < 0,001$ ); albumina ( $p = 0,001$ ) e gamaglobulina ( $p < 0,001$ ) nos três grupos de pacientes comparados ao grupo controle, indicando que, em resposta ao processo fibrogênico e inflamação que ocorrem nessas doenças há o concomitante aumento de enzimas hepáticas e de ECPM, aumentando os níveis séricos desses marcadores (KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; LICHTINGHAGEN; BAHR, 2004).

Observamos também que os pacientes com hepatite C apresentaram níveis mais elevados de ALT que os pacientes com EHE ( $p < 0,001$ ). Maiores níveis de AST e bilirrubinas foram observados no grupo dos co-infectados também em relação ao grupo com EHE ( $p = 0,005$ ) e ao grupo com hepatite C respectivamente ( $p <$

0,001). Tanto a ALT como AST são enzimas associadas a danos celulares e atividade da doença, refletindo a replicação viral nos pacientes com hepatite C e co-infectados (FONTANA; LOK, 2002; GEBO et al., 2002), enquanto que a EHE não exibe atividade necroinflamatória significativa (KAMAL et al., 2000; KAMAL et al., 2004). Apesar de existirem controvérsias em relação à associação de níveis de ALT e o risco de progressão para cirrose (FREEMAN et al., 2003). Pal et al. (2006) demonstraram que a replicação viral estava fortemente associada com inflamação e fibrose hepática e altos níveis de ALT em pacientes portadores do HCV.

Além disso, a relação AST/ALT foi mais elevada também nos pacientes co-infectados em relação aos pacientes com hepatite C e EHE apenas, relação essa que está associada com cirrose hepática em vários estudos, mais uma vez sugerindo uma maior severidade da doença nos pacientes co-infectados ( $p < 0,001$ ).

Após realizarmos as comparações dos níveis dos marcadores biológicos entre os 3 grupos de pacientes, seguimos na análise dos níveis dos marcadores em relação aos graus de fibrose em cada grupo de pacientes separadamente, com o objetivo de encontrar um marcador que pudesse diferenciar com segurança fibrose leve da fibrose severa em cada doença.

Apesar de níveis séricos de TNF- $\alpha$  em pacientes com hepatite C terem sido relacionados com o grau de inflamação hepática (NEUMAN et al., 2002; KAMAL et al., 2006), no nosso estudo isso não foi observado e sim uma relação dessa citocina com grau de fibrose e com “cut-off” de 2,81 pg/ml seus níveis séricos puderam diferenciar fibrose severa da fibrose leve com 85,67% de certeza.

Vários estudos correlacionaram os níveis elevados de ácido hialurônico como marcador de fibrose severa, principalmente com a cirrose na hepatite C. Seus níveis se elevam durante o processo fibrogênico, pela síntese aumentada de ECPM pelas células estreladas hepáticas ativadas pela inflamação e necrose via citocinas e diminuição de sua eliminação pelas células endoteliais sinusoidais (WONG et al., 1998; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; PATEL et al., 2003). Nossos resultados mostraram que com um “cut-off” de 11,90 ng/ml, o ácido hialurônico pode ser usado como marcador não invasivo de fibrose hepática ou cirrose, diferenciando os pacientes com fibrose severa e leve com 76,19% de certeza.

Em relação à FA, tanto em comparação com graus de fibrose como com atividade inflamatória, foi observado que essa enzima pode ser usada como

marcador de fibrose e atividade severa em pacientes com hepatite C, com 93% e 90% de certeza respectivamente, concordando com estudos que demonstraram associação de níveis elevados de FA principalmente com a cirrose hepática, onde a fibrose e atividade inflamatória atingem maior severidade (FONTANA; LOK, 2002; GEBO et al., 2002).

Como esperado e demonstrado em outros estudos, as enzimas relacionadas a danos celulares, como inflamação e necrose, a ALT e AST se mostraram elevadas naqueles pacientes com hepatite C com atividade inflamatória severa (IMBERT-BISMUT et al., 2001; POYNARD et al., 2002; FONTANA; LOK, 2002; GEBO et al., 2002), podendo ser usadas no diagnóstico clínico como marcadores de inflamação com cut-off de 96,50% para a ALT e 59,50% para AST com certeza de 84,62% e 83,33% respectivamente.

Ainda nos pacientes com hepatite C observamos a correlação entre os níveis séricos de IL-13 e RNAm de IL-13 nas biópsias hepáticas ( $p = 0,038$ ), sugerindo que os níveis séricos podem estar refletindo a regulação da produção de ECMP no fígado. Kamal et al. (2006) encontraram correlação semelhante em relação aos níveis de TGF- $\beta$ , que assim como a IL-13, é um conhecido mediador fibrogênico, e o RNAm dessa citocina nas biópsias hepáticas, indicando também que seus níveis séricos estariam relacionados com a produção de ECMP.

Em relação aos pacientes co-infectados, apesar dos níveis de ALT e AST se correlacionarem com os graus de atividade inflamatória hepática podendo ser usados como marcadores preditores de inflamação e necrose, diferenciando atividade inflamatória A0, A1 com atividade A3 e de maneira ainda mais sensível e achado muito importante, atividade A2 com atividade A3, que é onde a maioria dos marcadores não-invasivos estudados até o momento falham em diagnosticar, que são os níveis intermediários de inflamação e fibrose (POYNARD et al., 2004, 2005). Entretanto, os níveis dessas enzimas não se mostraram significativamente mais elevados nos pacientes co-infectados em relação aos pacientes com hepatite C apenas, como era esperado de que na associação das doenças houvesse uma maior severidade da lesão hepática (KAMAL et al., 2000, 2001, 2004, 2006; EL-KADY et al., 2004).

Ainda em relação à atividade inflamatória, foi observado que os níveis elevados de ácido hialurônico ( $p = 0,011$ ) e gamaglobulinas ( $p = 0,013$ ) se

relacionaram com atividade inflamatória severa. O ácido hialurônico como já discutido estaria aumentado associado à fibrose severa e cirrose e inflamação e necrose (KÖPKE-AGUIAR et al., 2002).

Nenhum dos marcadores analisados se correlacionou com graus de fibrose avaliada nas biópsias hepáticas nos pacientes co-infectados, possivelmente devido ao número pequeno da amostra. Entretanto, quando comparamos com os graus de fibrose avaliados através de ultrasonografia tanto a albumina, como a fosfatase alcalina diferenciaram pacientes com graus I e II de fibrose periportal, sendo os níveis de albumina produzidos em menor quantidade pelo fígado à medida que a fibrose aumenta e por isso sendo útil marcador em estágios mais avançados de fibrose hepática e cirrose onde a função hepática se encontra prejudicada. Entretanto, os níveis de fosfatase alcalina encontraram-se mais elevados nos pacientes com grau II, indicando provável agressão aos ductos biliares com sensibilidade de detecção como marcador de fibrose também em fibrose avançada e cirrose (LICHTINGHAGEN; BAHR, 2004).

Nos pacientes com EHE apenas um marcador se relacionou com fibrose periportal grau III ou fibrose de Symmers que foi a  $\gamma$ -GT. Embora os mecanismos de aumento dessa enzima nos soros de pacientes esquistossomóticos crônicos não esteja totalmente esclarecido, sugere-se que a agressão aos ductos biliares preceda o desenvolvimento de hipertensão portal nesses pacientes, indicando que essa enzima pode ser útil marcador de hipertensão portal concomitantemente com a redução do número de plaquetas associado ao hiperesplenismo observado na forma hepatoesplênica da esquistossomose (MARTINS; BORGES, 1993; KÖPKE-AGUIAR et al., 2002; SOUZA; TOLEDO; BORGES, 2000).

A IL-13, juntamente com TGF- $\beta$  e IL-4, é considerada o principal mediador fibrogênico na esquistossomose murina e estudos recentes em humanos também correlacionaram níveis elevados dessa citocina com desenvolvimento de fibrose hepática mais severa (RIBEIRO DE JESUS et al., 2004). Entretanto, nenhuma diferença estatística foi observada entre níveis de RNAm de IL-13 e níveis séricos de citocinas pró-fibróticas e anti-fibróticas e graus de fibrose nos pacientes com EHE selecionados para esse estudo não adicionando muito valor como marcadores bioquímicos. Entretanto, outros marcadores bioquímicos são mais fáceis de dosar e

são de menor custo comparados com as dosagens de citocinas (IMBERT-BISMUT et al., 2001).

Muitos estudos demonstraram que a cirrose, geralmente um processo irreversível, e a fibrose hepática, regridem com a remoção do agente patogênico e seu tratamento específico (HAMMEL et al., 2001; DESMET; ROSKAMS, 2004). Nossos resultados sugerem a inclusão na prática clínica da dosagem de alguns marcadores bioquímicos para avaliação do grau de fibrose na hepatite C, EHE e co-infecção substituindo ou diminuindo a necessidade de realização de biópsias hepáticas. A utilização desses marcadores, como um método não invasivo é extremamente importante para avaliar a progressão da fibrose, prognóstico e decisões de tratamento nessas doenças.

Diante disso, como perspectiva de nosso trabalho, sugerimos a realização de uma próxima etapa, com um estudo prospectivo, aumentando o número de pacientes com hepatite C, EHE e co-infectados, e dosando os marcadores bioquímicos associados com fibrose e inflamação. Esses marcadores seriam associados para a formação de índices biológicos de fibrose para tentarmos obter valores preditivos positivos e negativos mais definidos em relação a presença ou ausência de fibrose. Importante salientar que, um índice biológico para que seja útil deve ser composto de parâmetros que estão sendo utilizados na rotina e ter uma interpretação diagnóstica superior à daqueles componentes utilizados isoladamente. Por fim, aplicar esse índice e tentar correlacioná-lo com estágio da fibrose em outras doenças hepáticas crônicas e como também como acompanhamento da regressão da fibrose nessas doenças após tratamento específico com a diminuição dos níveis dos marcadores.

## 7 CONCLUSÕES

Após análise estatística dos nossos resultados através das comparações das dosagens dos marcadores bioquímicos e citocinas com os graus de fibrose e/ou atividade inflamatória nos pacientes estudados, podemos concluir que:

Nos pacientes com hepatite C:

- De acordo com as sensibilidades e especificidades, TNF- $\alpha$ , ácido hialurônico e FA foram considerados bons candidatos a marcadores bioquímicos para diferenciar fibrose leve e severa e ALT, AST e FA bons candidatos para diferenciar atividade inflamatória leve e severa em pacientes com hepatite C.
- A FA parece ser um marcador mais promissor, uma vez que diferenciou a fibrose e a atividade inflamatória leve e severa na hepatite C, apresentando boa sensibilidade e especificidade.

Nos pacientes co-infectados:

- Os possíveis candidatos a marcadores para diferenciar atividade inflamatória leve e severa foram ALT, AST, ácido hialurônico, plaquetas e gamaglobulinas. No entanto, o número de pacientes foi insuficiente para avaliarmos as sensibilidades e especificidades desses marcadores.

Nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica:

- A  $\gamma$ -GT e relação AST/ plaquetas, foram considerados possíveis candidatos a marcadores para diferenciar fibrose grau II e III avaliados através de ultrasonografia. No entanto, o número de pacientes foi insuficiente para avaliarmos as sensibilidades e especificidades desses marcadores.

**REFERÊNCIAS**

ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22 n. 2, p. 85-91, 2006.

AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 27, supl. 3, p. 73, 1994.

AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 22, p. 12766-12771, 1999.

ANDRADE, Z. A. A hepatite crônica esquistossomótica. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v.62, p. 563-564, 1962.

ANGELICO, M. et al. Chronic liver disease in Alexandria governorate, Egypt: contribution of schistosomiasis and hepatitis virus infections. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 236-243, 1997.

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.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. for the METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, p. 289-293, 1996.

BENVEGNÚ, L. et al. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus- related cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 25, p. 211-215, 1997.

BIGGER, C. B.; BRASKY, K. M.; LANFORD, R. E. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 15, p. 7059-7066, 2001.

BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- gamma, high TNF- alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, p. 1295-1303, 2004.

BUCHARD, G. D. et al. *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in Senegal: lack of correlation between liver morphology in ultrasound and connective tissue metabolites in serum. **Tropical medicine and international health**, Oxford, v. 3, p. 234-241, 1998.

CHIARAMONTE, M. G. et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T helper type 2-dominated inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 104, p. 777, 1999.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine Schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 273-282, 2001.

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.

CID, L. V. et al. Anastomose espleno- renal seletiva e hepatite pós- transfusional. Seguimento a curto e médio prazos. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 22, p. 109-112, 1985.

COELHO, P. M. Z.; TAVARES, C. A. P. Diagnóstico Imunológico. In: CASTRO L. P.; ROCHA, P. R. S.; CUNHA, A. S. **Tópicos em Gastroenterologia 2: Gastroenterologia tropical**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1991. p. 27-36.

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.

COOPER, S. et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. **Immunity**, Cambridge, v. 2, p. 439-449, 1999.

DESMET, V. J.; ROSKAMS, T. Cirrhosis reversal: between dogma and myth. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 40, n. 5, p. 860-867, 2004.

DESSEIN et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gama receptor gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 65, p. 709-721, 1999.

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.

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

DUSEK, J.; KNABASTA, M.; KODOJNSEK, R. Needle biopsy of liver in schistosomiasis mansoni: the value of histological examination. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 68, p. 1888-195, 1965.

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.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Consensus statement. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. **Journal of hepatology**, Oxford, v. 30, p. 956-961, 1999.

EL KADY, I. M. et al. Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-18 and IFN- $\gamma$  cytokines pattern in patients with combined hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* infections. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 61, p. 87-91, 2004.

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. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 2585-2591, 2000.

FARCI, P. et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 15934-15939, 1996.

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. M. et al. *Schistosoma* infection inhibits cellular immune responses to HCV core peptides. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 27, p. 189-196, 2005.

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.

FONTANA, R. J.; LOK, A. S. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, p. 57-64, 2002.

FORNS, X. et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, p. 986- 992, 2002.

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.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

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

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.

GEBO, K. A. et al. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, p. 161-172, 2002.

GRETCH, D. R. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v. 1, n. 3, p. 543-557, 1997.

GRYZCH, 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.

HAGAN, P. et al. Human IgE , IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma heamatobium*. **Nature**, London, v. 349, p. 243-245, 1991.

HAGAN, P.; ABATH, F. G. C. Recent advances in immunity to human schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 95-98, 1992.

HAMMEL, P. et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 344, p. 418-423, 2001.

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.

HENRI, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 929-936, 2002.

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 incuce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 6406-6416, 2000.

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

IMBERT- BISMUT, F. I et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. **The Lancet**, London, .357, p. 1069-1075, 2001.

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**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 281-289, 2000.

KAMAL, S. M., et al. Specific Cellular Immune Response and Cytokine Patterns in Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 184, p. 972-982, 2001.

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. **The Journal of Infections Diseases**, Chicago, v. 189, p. 1140-1150, 2004.

KAMAL, S. M. et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 43, n. 4, p. 771-779, 2006.

KÖPKE-AGUIAR, L. A. et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to access severity of liver disease in schistosomiasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 84, p. 117-126, 2002.

LAMBERTUCCI, J. R. *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects In: JORDAN, P.; WEBBE, G.; STURROCK, R. F.(Ed.). **Human schistosomiasis**. Wallingford: Cab International, 1993. p. 195-235.

LAMBERTUCCI, J. R.; BARRAVIERA, B. Esquistossomose mansônica. Estudo clínico. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 67, p. 59-100, 1994.

LICHTINGGHAGEN, R.; BAHR, M. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. **Expert Review in Molecular Diagnostics**, London, v. 4, n. 5, p. 715-726, 2004.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. In: FIELDS, B. N. et al. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. v. 1, p. 991-1041.

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.

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

MARTINS, R. D.; BORGES, D. R. Ethanol challenge in non-alcoholic patients with schistosomiasis. **Journal of Clinical Pathology**, New York, v. 46, p. 250-253, 1993.

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.

MONTENEGRO, S. M. L. et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, p. 1502-1514, 1999.

MORAIS, C. N. L. et al. Studies on the production and regulation of interleukin- IL-13, IL-4 and interferon- $\gamma$  in human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 113-114, 2002.

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.

MYERS, P. R. et al. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 97, p. 2419-2425, 2002.

NASCIMBENI, M. et al. Kinetics of CD4 + and CD8+ memory T cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 4781-4793, 2003.

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

NEUMAN, M. G. et al. Serum tumour necrosis factor- and transforming growth factor- $\beta$  levels in chronic hepatitis C are immunomodulated by therapy. **Cytokine**, San Diego, v. 17, n. 2, p. 108-117, 2002.

PAL, S. et al. Intrahepatic hepatitis C virus replication correlates with chronic hepatitis C disease severity in vivo. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 2280-2290, 2006.

PAN, C H et al. T-cell antigenic determinants within hepatitis C virus nonstructural protein 3 and cytokine production profiles in hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 9, p. 258-264, 2002.

PATEL, K. et al. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 18, p. 253-257, 2003.

PAWLITSKY, 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.

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

PESSIONE, F. et al. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 27, p. 1717-1722, 1998.

POKROVSKII, G. I. Chronic hepatitis C: modern notions of pathogenesis and morphogenesis. Concept of antiviral protection in hepatocytes. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, London, v. 135, n. 4, p. 311-321, 2003.

POYNARD, T; BEDOSSA, P; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **The Lancet**, London, v.349, p. 825-832, 1997.

POYNARD, T. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 9, p. 128-133, 2002.

POYNARD, T. et al. Viral Hepatitis C. **The Lancet**, London, v.362, p. 2095-2100, 2003.

POYNARD, T. Treatment of hepatitis C virus: the first decade. **Seminars in liver disease**, New York, v. 24, p. 19-24, 2004.

POYNARD, T. et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and viopsy in patients with chronic hepatitis C. **Clinical Chemistry**, New York, v. 50, p. 1344-1355, 2004.

POYNARD, T. et al. Fibrotest-Fibro Sure: towards a universal biomarker of liver fibrosis? **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2005.

RABELO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n.5, p. 669-676, 1997.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 24, p. 456-464, 2003.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, p. 215-229, 2005.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO DE JESUS, A. et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, 2004.

RENOU, C. C. et al. Relevance of moderate and isolate thrombopenia as a strong predictive marker of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus. **Hepatology**, Baltimore, v. 32, p. 421A, 2000.

RICARD-BLUM, S. et al. Relationships between several markers of extracellular matrix turn-over and ultrasonography in human schistosomiasis mansoni. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 658-663, 1999.

SARNO, E. N. et al. Anastomose espleno-renal seletiva e hepatite B pós-transfusional: seguimento a curto e médio prazos. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 22, p.109-112, 1985.

SERUFO, J. C.; LAMBERTUCCI, J. R. Esquistossomose e hepatites virais: uma revisão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 313-322, 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.

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.

SOUZA, M. R.; TOLEDO, C. F.; BORGES, D. R. Trombocytopenia as a predictor of portal hypertension in schistosomiasis. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 45, n. 10, p. 1964-1970, 2000.

STUYVER, L. et al. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 9, p. 2259-2266, 1996.

SU, A. I. et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 24, p. 15669-15674, 2002.

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.

STORDEUR, P. et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 259, p. 55-64, 2002.

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

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.

THULUVATH, J. P.; KROK, K. L. Noninvasive markers of fibrosis for longitudinal assessment of fibrosis in chronic liver disease: are they ready for prime time? **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 101, p. 1497-1499, 2006.

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.

WAI, CHUN-TAO et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 38, p. 518-526, 2003.

WILLIAMS, A. L.; HOOFNAGLE, J. H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 95, n. 3, p. 734-739, 1988.

WONG, V. S. et al. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 5, p. 187-192, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Proposal for a practical guide to the standardized use of ultrasound in the assessment of pathological changes.** Meeting on ultrasonography in schistosomiasis. Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Information. **Schistosomiasis.** Geneva. 1996. (Fact Sheet n. 115). Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/enfact115.html>>. Acesso em: 25 de setembro de 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Information. **Hepatitis C.** Geneva, 2000. (Fact Sheet n° 164). Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact164.html>>. Acesso em: 30 de agosto de 2003.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W.; Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, p. 505-511, 1995.

WYNN, T. A. et al. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p. 1430-1440, 1993.

ZEUZEM, S.; RUSTER, B.; ROTH, W. K. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplicor HCV) for detection of hepatitis C virus. **Zeitschrift fur Gastroenterologie**, Grafelfing, v. 32, n. 6, p. 342-347, 1994.

## **APÊNDICES**

## **APÉNDICE 1**

## SHORT COMMUNICATION

## Evaluation of Tests Based on the Antibody Response to Keyhole Limpet Haemocyanin and Soluble Egg Antigen to Differentiate Acute and Chronic Human Schistosomiasis Mansoni

Lílian Beck\*, Daniele SM Van-Lüme/<sup>++</sup>, Joelma R de Souza, Clarice N Lins de Moraes, Wladimir G Melo, Edeneide Xavier, Constança S Barbosa, Marcílio L Aroucha<sup>\*\*</sup>, Ana Lúcia C Domingues<sup>\*\*</sup>, Tereza Favre\*, Otávio Pieri\*, Frederico GC Abath, Sílvia ML Montenegro/<sup>+</sup>

Departamento de Imunologia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n°, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil \*Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ Brasil \*\*Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Specific IgG and IgM responses to soluble egg antigen (SEA) and keyhole limpet haemocyanin (KLH) were measured by ELISA in patients with acute and chronic schistosomiasis. The tests based upon IgM and IgG antibodies responses to KLH presented the best diagnostic discrimination, and can be used in conjunction with clinical and epidemiological data to the differential diagnosis of acute schistosomiasis.*

Key words: keyhole limpet haemocyanin - soluble egg antigens - enzyme-linked immunosorbent assay

The diagnosis of schistosomiasis mansoni is classically made by stool parasitological techniques. In high and moderate prevalence areas, the detection of parasite eggs is simple and accurate (Tsang et al. 1983). However, the sensitivity of parasitological methods decreases in areas where the prevalence and intensity of transmission of schistosomiasis are low (Noya et al. 1997), and there are suggestions that, in this situation, serologic tests would be useful.

The discrimination of acute and chronic stages of the disease allows for early treatment and prevention of the severe forms of the disease. In addition, the possibility of diagnosing acute schistosomiasis contributes to defining geographic regions with active transmission (Valli et al. 1999). Although there are several serological approaches proposed to differentiate acute and chronic schistosomiasis, we have noticed some conflicting results (Verweij et al. 1995), justifying a re-evaluation of some of the proposed tests.

In this preliminary work we investigated the antibody responses to keyhole limpet haemocyanin (KLH) and soluble egg antigens (SEA) antigens, as markers of acute and chronic clinical forms of schistosomiasis.

We studied 54 patients with acute schistosomiasis from an unusual outbreak, caused by environmental imbalances

at Porto de Galinhas beach in 2000 (Barbosa et al. 2001) and 54 chronic patients including intestinal, hepatointestinal and hepatosplenic forms of schistosomiasis, from São Lourenço da Mata, an endemic area in the state of Pernambuco (Beck et al. 2001). The protocol study was approved by the Ethical Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz.

Blood samples (5 ml) were taken with heparin (10 U/ml) and after centrifugation, the plasma was kept frozen at -20°C until testing. Specific IgG and IgM antibodies to SEA and KLH were measured by ELISA. For simplicity, we will denominate these tests KLH IgM, KLH IgG, SEA IgM, and SEA IgG. The general ELISA procedures were performed according to Yuesereng et al. (1994) for KLH antigen and Valli et al. (1997) for SEA antigen. We used KLH and SEA at concentrations of 2 ng/μl and 10 μg/ml, respectively, for the detection of IgM and IgG antibodies. The dilutions of plasma were 1:2000 for the KLH IgM and KLH IgG, and 1:400 and 1:200 for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The horseradish peroxidase goat anti-human Ig was 1000 fold diluted for the KLH tests, and 2500 and 3000 diluted, for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The SEA antigen was obtained according to Pearce et al. (1991); the protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951), and aliquots were lyophilized in small aliquots before storing at -70°C.

The optical densities (OD) were transformed to AUE (arbitrary units of ELISA), that were defined as the ratio between the OD of the sample and the OD of a reference plasma. The cut-off was defined as the mean plus 1 standard error of plasma samples of chronic patients.

The groups with acute and chronic infection differed significantly respecting the levels of IgM and IgG antibodies to KLH ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and SEA ( $p = 0.0002$  and  $p < 0.0001$ , respectively) (Figure).

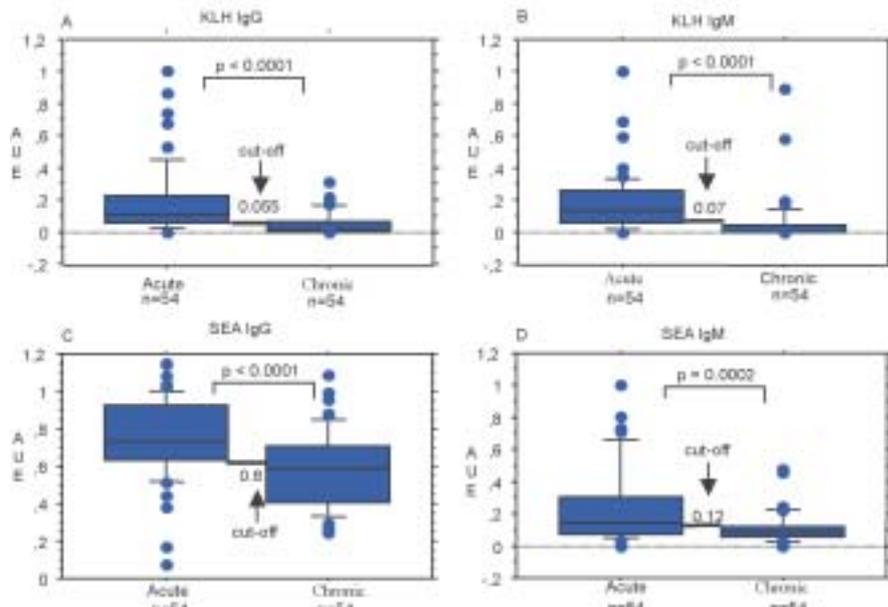
Financial support: CNPq, Fiocruz

<sup>+</sup>Corresponding author. Fax: + 55-81-3453.1911. E-mail: silvia@cpqam.fiocruz.br.

<sup>++</sup>Fellow CNPq, Pibic-Fiocruz

Received 28 May 2004

Accepted 26 July 2004



Box plot percentiles of the levels of IgG and IgM antibodies to keyhole limpet haemocyanin (A and B), and soluble egg antigens (C and D), measured by ELISA in plasma of acute and chronic schistosomiasis patients, were expressed as AUE (arbitrary unit of ELISA). The cut-off is indicated by arrow.

Finally, we calculated the sensitivity to detect acute cases and the specificity to detect chronic cases for each assay. The sensitivities of KLH IgG, KLH IgM, SEA IgG and SEA IgM were 74.5, 70.9, 80 and 56.4%, respectively. The specificities of KLH IgG, KLH IgM, SEA IgG and SEA IgM were 72.2, 79.6, 51.9 and 75.9%, respectively. Thus, KLH IgM, and KLH IgG were the tests that displayed the best diagnostic discrimination, providing the best trade off between sensitivity and specificity were taken into account.

The results show that the evaluated assays can be used in conjunction with clinical and epidemiological data in attempts to discriminate acute and chronic schistosomiasis. Although we have focused in the discrimination of acute and chronic schistosomiasis in patients previously diagnosed with schistosomiasis, we are currently evaluating the possibility to use combinations of serological tests to simultaneously establish the diagnosis of schistosomiasis, and discriminate different clinical forms of the disease. In addition, we are analyzing more deeply the results using additional statistical tools, including receiver-operating characteristics analysis.

#### REFERENCES

- Barbosa CS, Domingues ALC, Abath FGC, Montenegro SML, Guida U, Carneiro J, Tabosa B, Moraes CNL, Spinelli V 2001. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cad Saúde Públ* 17: 725-728.
- Beck L, Favre TC, Pieri OS, Zani LC, Domás GG, Barbosa CS 2001. Replacing oxamniquine by praziquantel against *Schistosoma mansoni* infection in a rural community from sugarcane zone of Northeast Brazil: an epidemiological follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 (Suppl. 1): 165-167.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275.
- Noya BA, Cesari IM, Losada S, Colmenares C, Balzan C, Hoebeke J, Noya O 1997. Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop* 66: 69-78.
- Pearce EJ, Caspar P, Gryzch JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exper Med* 173: 159-164.
- Tsang VCW, Tsang KR, Hancock K, Kelley MA, Wilson BC, Maddison SE 1983. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serological reagent. I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *J Immunology* 130: 1359-1365.
- Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM, Silva MIPG, Velloso SAG, Garcia ET 1997. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and serological distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 57: 358-362.
- Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze R 1999. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 61: 302-307.
- Verweij JJ, Polderman AM, Visser LG, Deelder AM 1995. Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 48-50.
- Yuesheng L, Rabello ALT, Simpson AJG, Katz N 1994. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 249-251.

## **APÉNDICE 2**

# Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?

Frederico G.C. Abath<sup>1</sup>, Clarice N.L. Morais<sup>1</sup>, Carlos Eduardo L. Montenegro<sup>2</sup>, Thomas A. Wynn<sup>3</sup> and Silvia M.L. Montenegro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina da Universidade de Pernambuco, R. Arnobio Marques 310, Santo Amaro, 50100-130, Recife, Brazil

<sup>3</sup>Immunopathogenesis Section Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 50 South Drive, Bethesda, MD 20892, USA

**Studies in mice indicate that schistosome egg-induced granuloma formation and hepatic fibrosis depend markedly on cytokine regulation, with interleukin 10 having a central role. There is no clear consensus about the pattern of cytokine production and regulation that causes a minority of chronically exposed patients to develop severe hepatosplenic (HS) disease, which is characterized by periportal fibrosis and portal hypertension. HS disease and the progression of hepatic fibrosis are associated with the production of profibrotic type 2 cytokines in the early stages of infection with *Schistosoma mansoni*. However, other studies indicate that HS disease is characterized by a predominant T helper 1 profile. Until new tools and approaches are developed to study human disease in endemic areas, investigators must either speculate about indirect evidence from human studies or rely more heavily on findings generated from experimental models of the disease.**

## The host–schistosome interaction

The balance between host and infectious agents tends towards a state of mutual survival. For the pathogen, this balance depends on the level of cell and tissue damage caused by the infectious agent and on the kinetics of infection. For the host, survival depends on mechanisms of innate resistance and on the repertoire of T cells and B cells that are responsible for providing adaptive immunity. Raising an immune response can compromise the host significantly because some damage to the host cells and tissues is often an inevitable side-effect of an effective immune response [1]. In schistosomiasis, although some damage can result from egg products (hepatotoxins) and worm antigens, the pathology caused by the parasite is limited. Most chronic morbidity is related to the T-cell-dependent immune response of the host, which is directed against the eggs of the parasite. **Box 1** presents an outline of the general features of the immune response in

infectious diseases. The optimal homeostatic balance of immune reactivity that leads to maximum resistance and minimum morbidity is met with varying success in each host–schistosome interaction, depending on the parasite burden and the immunoregulatory state of the host [2]. Nonetheless, several other factors need to be taken into account, such as host and parasite genetics, nutritional status and concurrent diseases, which are discussed later. Disease following infection with *Schistosoma mansoni* develops primarily as a consequence of chronic granulomatous inflammation in the liver, which results in hepatic periportal fibrosis (see Glossary). Eggs laid by adult parasites are trapped in the liver, along the periportal tissues, a process that leads to marked inflammation, tissue eosinophilia, collagen deposition and, ultimately, fibrous expansion of the portal spaces and intrahepatic portal-vein obstruction. Granulomas in schistosomiasis depend predominantly on CD4<sup>+</sup> T cells and represent a form of delayed-type hypersensitivity [3,4]. Experimental schistosome infections of laboratory animals, particularly mice, are used frequently to model the pathophysiological features of the infection in humans. These experimental models have contributed greatly to the understanding of the immunopathology of infection, particularly to the mechanisms that are associated with granuloma

## Glossary

**Acute schistosomiasis:** syndrome that occurs during the first six months after exposure to infested water; typically occurs upon first exposure.

**Chronic HS:** hepatomegaly usually accompanied by signs of portal hypertension (splenomegaly, esophageal varices). A minority of patients progresses to this clinical form in a time course of years. In the severe form of HS disease, signs of portal hypertension are dominant.

**Degree of fibrosis:** this ultrasonographic classification was used in Ref. [24]. Hepatic fibrosis is defined as grade 0 if the periportal tract thickness is <3 mm, as grade I if it is 3–5 mm thick, as grade II if it is >5–7 mm thick and as grade III if it is >7 mm thick.

**HI disease:** there are intestinal symptoms and hepatomegaly but no detectable splenomegaly.

**Intestinal disease:** there are intestinal symptoms but no detectable hepatomegaly.

**Periportal fibrosis:** also known as Symmers' fibrosis; on the cut surface of the liver, this lesion appears as fibrous plaques that replace portal spaces on a background of normal-looking hepatic parenchyma.

### Box 1. Features of the immune response in infectious diseases

Many infectious diseases are considered to be associated with either Th1 or Th2 cytokines, depending on the predominant immune response involved [8,45]. The CD4<sup>+</sup> Th1–Th2 dichotomy was established first in the mouse model and demonstrated subsequently in humans [45]. Depending on the cytokine milieu and several other factors, these T cells can differentiate into either Th1 cells (which produce IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) or Th2 cells (which produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13). Th1 cytokines activate cytotoxic and inflammatory functions, and induce delayed-type hypersensitivity. By contrast, Th2 cytokines stimulate antibody production, particularly IgE responses, and enhance eosinophil proliferation and function. Th1 and Th2 responses are regulated reciprocally, thus, Th2 cytokines downregulate the production of Th1 cytokines and vice versa.

Recently, the Th1–Th2 dichotomy has been extended to CD8<sup>+</sup> (Tc1 and Tc2), and  $\gamma$  and  $\delta$  T cells. The Th0 response is characterized by the simultaneous release of Th1 and Th2 cytokines, and, currently, there are at least three major types of T-regulatory cells (Th3, Tr1 and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells), but their precise roles in infectious disease processes are under active investigation [46]. Regardless of whether the variation in cytokine synthesis by T cells represents a continuum or discrete subsets, there is a dramatic dichotomy between IL-2–IFN- $\gamma$ –LT and IL-4–IL-5–IL-10 responses in many T-cell clones and immune responses *in vivo*. Thus, the Th1–Th2 dichotomy remains an important functional division in the immune system, and several cell types might contribute to an overall type-1 or type-2 cytokine pattern [45,47].

formation and subsequent fibrotic scarring (Box 2). These mechanisms are not easily investigated in humans for ethical and operational reasons. Consequently, available knowledge on human responses to schistosomes falls far short of what is known about the mouse model. However, several considerations must be taken into account when interpreting results from experimental models because, in some aspects, the infection is not similar to the clinical situation in endemic areas [5–8] (Table 1). Thus, these studies need to be validated in humans. Although there are reviews concerned primarily with the immunopathology of experimental schistosomiasis [3,4,9,10], relatively few recent reviews have focused on immunopathogenic mechanisms inferred from human studies [7,8,11,12]. Thus, here we deal primarily with the immune response that is elicited by *S. mansoni* in humans, with a particular focus on the cytokine-mediated mechanisms that influence the development of the severe forms of the chronic disease.

#### The immune response in acute schistosomiasis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with acute disease have higher cellular proliferative responses to the parasite antigens soluble egg antigens (SEA) and soluble worm antigen preparation (SWAP) than patients with chronic disease [intestinal and severe hepatosplenic (HS)] [13]. In another study, patients

with acute disease respond strongly to parasite antigens (SEA and SWAP) with a mixed T helper (Th)1–Th2 cytokine profile [14]. In agreement with these findings, it was shown subsequently that parasite-specific and egg-specific responses to interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) peak in patients 16 weeks after exposure [15]. Individuals who are not exposed chronically produce substantially more IFN- $\gamma$  in response to either SEA or SWAP than patients with chronic intestinal disease, despite producing comparable amounts of interleukin (IL)-10 in response to parasite antigens [15]. Antigen-specific IL-5 responses are also detected in patients with acute infection, which indicates that the overall pattern of cytokine expression in individuals with acute disease is characterized by a mixed Th1–Th2 cytokine profile [15].

Cytokine-neutralization studies in the late stage of the acute phase (16 weeks after exposure) indicate that there is cross-regulation between IFN- $\gamma$  and IL-10, and that IL-10 contributes to the suppression of the Th1 response in this stage of the disease [15]. In another study [16], patients with acute schistosomiasis produced more IFN- $\gamma$  than chronically infected patients, but fewer patients with acute disease produced IL-10 in response to SEA. In the latter study [16], acute-phase patients were evaluated during the pre-patent period, 33–60 days after exposure, which might explain the discrepancy in IL-10 production observed in the two studies [15,16].

### Box 2. Granuloma formation and fibrogenesis in the murine model

In the murine model of schistosomiasis, the CD4<sup>+</sup> Th cell response evolves from a Th1- to a Th2-dominated response following egg production by adult worms [3,48]. Because Th2 cytokines dominate the response to schistosome eggs, phenotypically, the granulomas have a large distinctive population of eosinophils. During chronic infection, the Th2 response is downregulated at the same time as there is a slight increase in the Th1 response. This phenomenon marks the transition into the chronic stages of the infection, which is associated with the downmodulation of granuloma size and results in smaller, newly formed, periovular granulomas and reduced cytokine expression by CD4<sup>+</sup>T cells [4,26].

Although there is general agreement that CD4<sup>+</sup>T-cell responses are essential to granuloma formation in murine schistosomiasis, controversy surrounds the nature of the Th-cell response that is required [3,8,10,26,49]. However, it has become clear that Th2-associated (IL-4–IL-13) and Th1-associated (IFN- $\gamma$ –IL-12) cytokines have divergent roles in the regulation of fibrogenesis; IL-13 is the primary fibrogenic mediator in schistosomiasis, whereas TNF, IFN- $\gamma$  and IL-12 seem to have marked antifibrotic activity [4,27,39]. It has been shown

subsequently that the anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-type response depend on nitric oxide synthase 2 [50].

Mice that are deficient in IL-10, infected with *S. mansoni* and challenged intravenously with eggs of the parasite, develop a non-polarized, co-dominant Th1–Th2 response that results in a pronounced increase in the size of the egg-induced hepatic granulomas, particularly in the acute stage of the disease [26]. Several studies in mice show that the mortality and morbidity increases in infected mice that develop a polarized Th1 response as a result of deficient expression of IL-4 [8,27,51]. It is postulated that an atypical granulomatous response is responsible for the morbidity, because it fails to either contain or neutralize hepatotoxins produced by the miracidium inside the egg. By contrast, double-knockout mice that lack the genes that encode IL-10 and IL-12, which develop a polarized Th2 response, produce large granulomas and exhibit exacerbated hepatic fibrosis [27] that results in severe, chronic disease. These findings show that IL-10 has a central role in the pathogenesis of schistosomiasis, and demonstrate that maintaining expression of IL-10 during the acute and chronic phase is crucial for survival of the host.

**Table 1. Differences between the murine model of schistosomiasis and clinical features in endemic areas<sup>a</sup>**

Murine model	Human disease
Experimental infections involve a single exposure	Most schistosome infections are acquired gradually
Intensity of infection is generally high	Intensity of infection varies, but is generally low
Animals are infected with defined isolates of <i>S. mansoni</i>	Infection occurs with natural isolates of the parasite
Time of infection and infective parasite burden are defined	It is difficult to define how long individuals have been infected and the parasite burden
Studies conducted in animals with similar exposure to parasites	Studies with similar exposure levels are difficult to control and re-infection is a complicating factor
Some pathological features of chronic infection are difficult to reproduce in mice	Chronic liver disease is characterized by Symmers' fibrosis
Genetic background can be homogeneous	Genetic background is heterogeneous
Experimental design defines the time of investigation	Long-term investigation of patients with active disease is ethically precluded
Co-infection with other parasites can be avoided	Co-infection with other parasites is common

<sup>a</sup>Based on Refs [5–8].

### The immune response in chronic schistosomiasis

In people infected with *S. haematobium*, both Th1 and Th2 subsets are activated and might be downmodulated subsequently during ongoing, chronic infection. In addition, the inverse correlation between proliferation to soluble adult worm antigens after treatment and egg output indicates that infection with *S. haematobium* downmodulates T-cell proliferation [17]. Similarly, uninfected individuals who live in a region endemic for *S. mansoni* produce more IFN- $\gamma$  in response to SEA (ten times more) and SWAP (eight times more) than patients with patent infections [18], which indicates that the intensity of infection with *S. mansoni* affects the production of cytokines. This idea has been confirmed recently by the demonstration that patients who are infected heavily with *S. mansoni* produce high levels of IL-10 and low levels of IFN- $\gamma$  [19].

In contrast to patients with acute infections, individuals with the asymptomatic, intestinal form of the disease have weak responses to SEA and SWAP for both Th1 and Th2 cytokines [14]. Although the intensity of the Th2 immune response varies in different studies, it seems clear that chronically infected patients, particularly those with either intestinal or hepatointestinal (HI) disease, react to schistosome antigens with a dominant Th2 cytokine profile [20–22]. HS patients display prominent Th2 responses to both SEA and SWAP but fail to mount significant Th1 response to SEA, in contrast to patients with acute disease [14,15]. Nevertheless, another study has linked HS schistosomiasis with increased Th1 responses [22]. In this study, HS cases had higher tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IFN- $\gamma$  but lower IL-5 than non-HS patients when cells were stimulated with either SWAP or SEA. These differences, which are statistically significant by logistic regression ( $P < 0.05$ ) [22], agree partially with the cytokine profiles of *S. mansoni*-specific T-cell lines and clones. Although populations of T-cell clones derived from schistosomiasis patients were, on the whole, preferentially Th2–Th0, there are some differences between the diverse phases and forms of the disease [23]. As the disease progresses from asymptomatic to severe, a shift in the Th2–Th0 balance occurs, with a decrease in the number of Th2 clones and concomitant increase of Th0-like clones [23].

Although there is great variability in the profiles of immune responses in humans, a mixed Th1–Th2 response

(with a predominance of Th1 cytokines) is observed generally in acutely infected patients [16], followed by weak production of Th2 cytokines when the infection becomes chronic [21,22]. This is similar to the normal evolution of the immune response in murine schistosomiasis (Box 2). However, the cytokine profiles reported in patients with HS schistosomiasis are more variable [22,24]: some studies show an association with a Th1 [22] and others with a Th2 profile [24]. Possible explanations for these discrepancies are discussed below.

### The immunoregulatory role of IL-10 in schistosomiasis

IL-10 is thought to have an important role in regulating CD4<sup>+</sup>T-cell responses induced by the parasitic helminth *S. mansoni* in murine models, and seems to have a similar downregulatory role for Th1 cytokine responses in human schistosomiasis [15,25]. In murine schistosomiasis, the major role of IL-10 is to control excessive Th1 and Th2 polarization during infection [26,27]. It has been shown recently that IL-10-producing, regulatory T cells, which are derived, in part, from the naturally occurring CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> and Th2 population, cooperate to suppress the development of the Th1 response in experimental schistosomiasis [28,29]. A possible mechanism for suppression is inhibition of the parasite antigen-induced B7 costimulatory molecule expression by IL-10 [25,30].

Neutralization of IL-10 enhances SWAP-specific IFN- $\gamma$  production in cultures from a subset of patients who are chronically infected with *S. mansoni* [20,21]. A related study also shows that SEA-induced and SWAP-induced proliferative responses of PBMCs from patients with chronic intestinal schistosomiasis mansoni are increased by functional neutralization of IL-10 with monoclonal antibodies [13]. This effect seems to be specific to PBMCs from patients with chronic intestinal schistosomiasis because no increase in proliferation was detected in cells from patients with either acute or HS forms of infection. These findings indicate that different clinical forms of schistosomiasis might trigger different patterns of cytokine regulation. Further studies, using cytokine neutralization, show that patients who exhibit the acute, HI and HS clinical forms of the disease, regardless of their clinical category, displayed measurable cross-regulation between Th1 and Th2 cytokine responses, primarily between IFN- $\gamma$  and IL-10. Levels of IFN- $\gamma$  increased with IL-10 neutralization and vice versa [15]. However, no evidence for a role

for IL-10 in the downregulation of Th2 cytokine responses has been demonstrated in the murine model of schistosomiasis [31].

Although IFN- $\gamma$  production increases when endogenous IL-10 is neutralized, production of IFN- $\gamma$  in patients with chronic disease never reaches that observed in patients with more acute infections. Moreover, comparable amounts of IL-10 are produced in antigen-stimulated cultures from both acute and chronic schistosomiasis patients [15]. To determine whether the impaired Th1 cytokine response observed in HS schistosomiasis [13,15] is associated with a more global defect in cytokine production by antigen-presenting cells, the pattern of expression of several Th1-associated cytokines and IL-10 was analyzed following stimulation of whole blood cell (WBC) cultures with several T-cell-dependent and T-cell-independent stimuli [32]. In this study, the pattern of IFN- $\gamma$  production (used as a primary marker of the Th1 response) declined in WBC cultures stimulated with *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SAC) as patients progressed to the more clinically severe HS form of the disease [32]. Although effective at upregulating responses in cells from normal controls and from HI patients, neutralization of endogenous IL-10 failed to restore normal IFN- $\gamma$  levels in cells from HS patients. This, in addition to the fact that IL-10 production is similar in the normal control and HS groups but increased markedly in cultures from HI patients following stimulation with different stimuli, corroborates the idea that IL-10 is unlikely to be the sole mechanism responsible for the deficiency in Th1 cytokine expression [32]. Together, these studies demonstrate that the deficiency in the responsiveness of Th1 cells in chronic schistosomiasis is apparently unrelated to specific defects in IL-12, IL-10 and CD40–CD40L activity, and the mechanisms involved in this defect remain to be revealed.

Numerous other mechanisms have been proposed to explain the downmodulation that occurs in chronic murine infections, including a role for B cells [33], anti-idiotypic antibodies [34], CD8<sup>+</sup>T cells [35] and IL-13 receptor  $\alpha 2$  (IL-13R $\alpha 2$ ) [29,36,37]. Egg-specific antibodies (idiotypes) purified from the sera of patients with the asymptomatic chronic form of schistosomiasis stimulate T cells from the same patients to proliferate. Rabbit antibodies raised against these idiotypes cross-react with idiotypes from mice with chronic infection, which defines cross-reactive idiotypes (CRIs) [34]. By contrast, patients with severe HS disease and an unusual subset of infected mice that develop a condition that is analogous to HS disease do not express CRIs. The association of CRIs with less severe pathology, combined with the ability of CRIs to stimulate the production of granuloma-inhibiting cytokines (IFN- $\gamma$ ), indicates that they might have an important role in regulating the pathology of chronic schistosomiasis [38]. The findings from these studies of idiotype regulatory pathways are remarkably consistent between human and mouse schistosomiasis [34,38].

### Immune response and risk of hepatic fibrosis

A minority of patients develops the most severe clinical form of schistosomiasis, probably under the influence of

many factors (Box 3). Portal fibrosis that resembles Symmers' fibrosis has been described in mice; however, the chronicity of schistosome infection in humans is not reproducible in the murine model [6]. An abundance of information from murine studies links Th2 rather than Th1 responses with the development of hepatic fibrosis [4,39]. By contrast, some studies in Africa, which include children and are based on clinical examination, show that HS schistosomiasis is linked with low levels of IL-5 and correspondingly high levels of IFN- $\gamma$ , and TNF produced by PBMCs stimulated with schistosome antigens [22]. In addition, hepatosplenomegaly correlates with elevated plasma levels of soluble TNF receptor I (sTNFR-I), sTNFR-II and soluble intercellular adhesion molecule (sICAM) [22]. The authors suggest an involvement of Th1 responses to schistosome antigens, upregulated proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in the development of HS disease. This study [22] supports the idea that, during acute infections, patients have vigorous, predominantly Th1, responses to parasite antigens that, with continued infection, are modulated in most patients. However, chronic HS patients continue to be high Th1 responders because they fail to produce counteracting Th2 cytokines [7].

In a subsequent study in Uganda, the same group observed a differential association between either TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  and fibrosis [40]. This study used ultrasonography to detect periportal fibrosis, and included a cohort aged 7–50 years, who had been resident in an area of high transmission for either ten years or since birth. It was concluded that the risk of fibrosis is associated with production of TNF- $\alpha$  [40]. A protective effect of IFN- $\gamma$  was also observed in adult women, which indicates that, depending on age and gender, different cytokine profiles might be associated with hepatosplenomegaly and periportal fibrosis [40]. Multivariate analysis has identified a significant (inverse) association between IFN- $\gamma$  and periportal fibrosis; high levels of IFN- $\gamma$  are associated with a reduced risk of periportal fibrosis and portal hypertension [41]. This concurs with studies in mice that show antifibrogenic activity of this cytokine [27,39]. However, TNF- $\alpha$  is positively associated with periportal fibrosis, possibly by balancing the protective effect of IFN- $\gamma$  [41]. These results, plus observations in experimental models, strongly indicate that IFN- $\gamma$  has a key role in protecting patients infected with *S. mansoni* against periportal fibrosis, whereas TNF- $\alpha$  might aggravate the disease [41]. Because HS disease is a long-term complication of schistosomiasis mansoni and is considered to indicate severe hepatic and periportal fibrosis, it is conceivable that the immune mechanisms that are responsible for this lesion occur much earlier during infection and precede the development of hepatosplenomegaly [24]. In this context, a recent study in Brazil has evaluated the cytokine profile after SEA stimulation of cells from patients who develop hepatic fibrosis in HI and early HS stages of the disease, and showed an association between a Th2 cytokine profile (IL-5, IL-10 and IL-13) and grade III hepatic fibrosis [24]. The patients were categorized as presenting the early stages of HS disease on the basis of small spleen size, and no past digestive bleeding

### Box 3. Multiple factors, including host genetics, cause a minority of patients to develop severe HS disease

Hepatic granulomatous inflammation and subsequent fibrosis associated with infection varies greatly from individual to individual. In a minority of cases, the inflammatory reaction can lead, in a time course of years, to severe HS disease that is characterized by periportal fibrosis, portal hypertension, gastrointestinal bleeding and death [41,52–54].

Several factors should be taken into account in the host–parasite relationship, and therefore, might influence both the development and the level of morbidity in an exposed population: degree and length of exposure, intensity of infection, concurrent pathologies, host and parasite genetics, and nutritional status [7,44] (Figure 1). All these factors might have a significant impact on the immune response that is elicited during the course of infection, and the intensity of infection. In this context, although the risk of developing severe HS disease correlates with both the intensity and duration of infection [55], it varies widely between individuals with comparable worm burdens. Whereas nutrition and co-infection contribute to this variation, host genetic effects might also be involved [56]. Indeed, in endemic populations, high levels of infection and severe periportal fibrosis cluster in some families [12,57]. Linkage analysis has identified the 5q31–33 chromosomal region as controlling resistance to infection

[12,58,59]. This region contains a cluster of cytokine genes that have central roles in the immune response [granulocyte–macrophage–colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13, interferon regulator factor 1 and colony-stimulating factor-1 receptor]. Mutations in the gene that encodes IL-13 account, in part at least, for susceptibility to infection [12]. Linkage analysis to map the gene responsible for developing severe hepatic fibrosis has identified significant linkage with markers of the 6q22–23 chromosomal region, including a marker in the gene that encodes the  $\gamma$  chain of the IFN- $\gamma$  receptor 1 [57]. Thus, polymorphisms in the gene that encodes IFN- $\gamma$  receptor might account for increased susceptibility to severe fibrosis. This hypothesis is consistent with reports showing that IFN- $\gamma$  has strong antifibrogenic activity and with immunological studies, carried out on the same population, that identify an association between periportal fibrosis and reduced production of IFN- $\gamma$  [41]. In addition, polymorphisms in the gene that encodes IFN- $\gamma$  are associated with severe fibrosis [12]. Finally, associations have been reported between some HLA class I alleles (A1 and B5) and hepatosplenomegaly in Egypt [12,56], and on HLA class II allele (*DQB1\*0201*) and biopsy-confirmed hepatic schistosomiasis in Brazil [60].

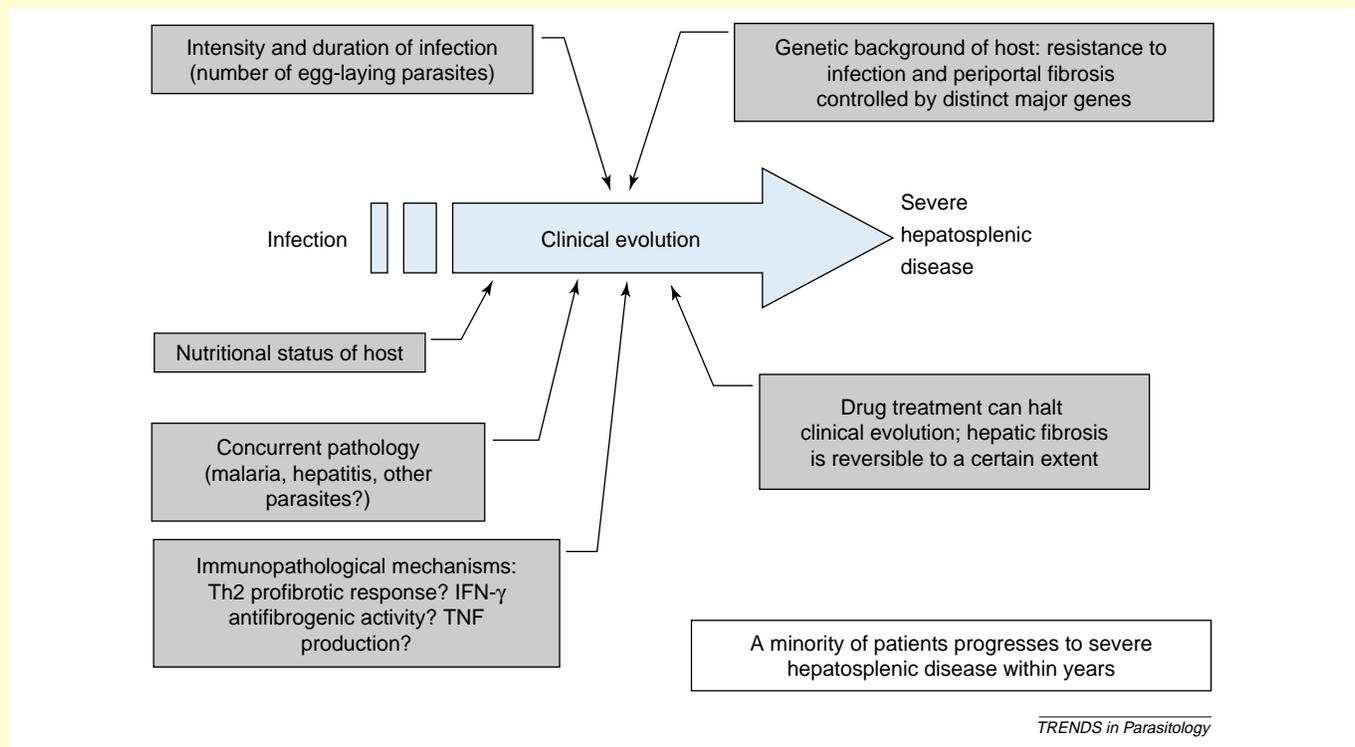


Figure 1. Multiple factors cause a minority of patients to develop severe HS schistosomiasis.

and other signs of severe portal hypertension, despite having grade III hepatic fibrosis. IL-5 and IL-13 were associated most strongly with severe hepatic fibrosis and also increased significantly in patients with increased hepatic fibrosis, judged by ultrasonographic examination after one year without treatment [24]. However, there is no statistical association between the degree of fibrosis and the production IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by PBMCs [24]. Another important point of this study is that the increase in IL-5 and IL-13 concentrations in patients with grade III liver fibrosis is only observed in SEA-stimulated cultures, which indicates that the Th2-type immunological response is directed primarily against egg antigens [24]. This study supports the hypothesis that the Th2 response

has a role in the progression of the hepatic fibrosis observed in chronic schistosomiasis. The apparent conflict this and studies of schistosomiasis patients from Africa might be explained by differences in the study designs, background of the populations and stages of the disease evaluated.

#### Concluding remarks

The pathology induced by schistosome eggs has been studied extensively in experimental models of infection. These studies show that the egg granuloma and hepatic fibrosis depend markedly on cytokine regulation [9,10]. How much of the results of work in mice can be extended to human disease is unknown, but recent evidence

indicates that some features of the immune response evoked in infected humans are similar to those in mice [11].

There is no clear consensus about the pattern of cytokine production and regulation that causes a minority of chronically exposed patients to develop severe HS disease, characterized by periportal fibrosis and portal hypertension. An association has been observed between a Th2 profibrotic type cytokine production in the early stages of the HS-disease process and the subsequent progression of hepatic fibrosis [24]. However, other studies indicate that HS disease is characterized by a predominant Th1 profile [22]. Although there is solid evidence in mice for a role for IL-13 and type-2 cytokines in the progression of hepatic fibrosis, the contribution of type-1 and type-2-associated cytokines to liver fibrosis in humans remains unclear. The development of severe periportal fibrosis is a chronic process, and represents the anatomical counterpart of the clinical condition known as HS schistosomiasis [42]. Nonetheless, some studies in Africa show hepatosplenomegaly and markers of increased portal pressure in a cohort of children in which periportal fibrosis is not detected by ultrasound, although further investigations are needed to exclude the potential influence of malaria and other factors [43]. Thus, definitive conclusions about this disease process require prospective studies that analyze the immune responses of many patients with active schistosomiasis for long periods from the initial infection. For operational and ethical reasons, most of the studies with human schistosomiasis are snapshots of this dynamic and, to a certain extent, reversible process, which hinders the discrimination between collagen-inducing cytokines and those that are produced in an attempt to reverse fibrogenesis. Moreover, several, potentially confounding, variables that are related to exposure and infection, co-infections, host factors, parasite genetics, and environmental modifiers cannot be controlled, or even properly assessed.

Finally, better tools to assess morbidity and a more appropriate standardization of case definitions for the clinical forms of schistosomiasis are needed, as are improved statistical analyses. All of these issues might explain some of the contradictory reports in the literature. One approach to tackling the complicated sets of data that can result from large human-population studies in which different schistosome antigens stimulate different cytokine responses is to combine factor analysis with a risk analysis, using a classification tree [40,44]. Clearly, many of the regulatory mechanisms that operate in humans are complicated and it is likely that investigators will continue to speculate about the basis of indirect evidence. That said, we must continue to strive to improve the techniques and approaches to study the human disease. Only then can effective modes of immunomanipulation, vaccination and treatment be generated.

#### Acknowledgements

Our work is funded by Fundação Oswaldo Cruz (internal funds) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). F.G.C.A. and S.M.L.M. are recipients of Research CNPq scholarships.

#### References

- Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (2001) Regulations of the immune response by antigen. *Science* 293, 251–253
- Phillips, S.M. (1993) Mechanisms of immunopathology in parasitic infections. In *Immunology and molecular biology of parasite infections* (3rd edn) (Warren, K.S., ed.), Blackwell Scientific Publications
- Stadecker, M.J. *et al.* (2004) The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201, 168–179
- Pearce, E.J. and MacDonald, A.S. (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 499–511
- Cheever, A.W. *et al.* (2000) Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today* 21, 465–466
- Cheever, A.W. *et al.* (2002) Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 917–940
- Dunne, D.W. and Pearce, E.J. (1999) Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect.* 1, 553–560
- Fallon, P.G. (2000) Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunol. Today* 21, 29–34
- Stavitsky, A.B. (2004) Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect. Immun.* 72, 1–12
- Wynn, T.A. *et al.* (2004) Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201, 156–167
- Hoffmann, K.F. *et al.* (2002) Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Adv. Parasitol.* 52, 265–307
- Dessein, A. *et al.* (2004) Interleukin-13 in the skin and interferon- $\gamma$  in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201, 180–190
- Malaquias, L.C. *et al.* (1997) Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand. J. Immunol.* 46, 393–398
- Williams, M.E. *et al.* (1994) Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *J. Infect. Dis.* 170, 946–954
- Montenegro, S.M. *et al.* (1999) Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 179, 1502–1514
- de Jesus, A.R. *et al.* (2002) Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* 185, 98–105
- Grogan, J.L. *et al.* (1998) Antigen-specific proliferation and interferon- $\gamma$  and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. *J. Infect. Dis.* 177, 1433–1437
- Viana, I.R.C. *et al.* (1994) Interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 466–470
- Silveira, A.M. *et al.* (2004) Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 514–519
- Araujo, M.I. *et al.* (1994) The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 1619–1625
- Araujo, M.I. *et al.* (1996) Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 26, 1399–1403
- Mwatha, J.K. *et al.* (1998) 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. *J. Immunol.* 160, 1992–1999
- Contigli, C. *et al.* (1999) Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms. *Clin. Immunol.* 91, 338–344
- de Jesus, A.R. *et al.* (2004) Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* 72, 3391–3397

- 25 King, C.L. *et al.* (1996) Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J. Immunol.* 156, 4715–4721
- 26 Wynn, T.A. *et al.* (1998) IL-10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J. Immunol.* 160, 4473–4480
- 27 Hoffmann, F.K. *et al.* (2000) 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. *J. Immunol.* 164, 6406–6416
- 28 McKee, A.S. and Pearce, E.J. (2004) CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.* 173, 1224–1231
- 29 Hesse, M. *et al.* (2004) The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172, 3157–3166
- 30 Flores-Villanueva, P.O. *et al.* (1996) Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J. Immunol.* 156, 3315–3320
- 31 Wynn, T.A. *et al.* (1997) Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses *in vivo*. *J. Immunol.* 159, 5014–5023
- 32 Montenegro, S.M. *et al.* (2002) Enhanced interleukin-12 and CD40 ligand activities but reduced Staphylococcus aureus Cowan 1-induced responses suggest a generalized and progressively impaired type 1 cytokine pattern for human schistosomiasis. *Infect. Immun.* 70, 5903–5912
- 33 Jankovic, D. *et al.* (1998) CD4<sup>+</sup>T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *J. Exp. Med.* 187, 619–629
- 34 Montesano, M.A. *et al.* (1990) Expression of cross-reactive, shared idiotypes on anti-SEA antibodies from humans and mice with schistosomiasis. *J. Immunol.* 145, 1002–1008
- 35 Pedras-Vasconcelos, J.A. and Pearce, E.J. (1996) Type 1 CD8<sup>+</sup>T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 157, 3046–3053
- 36 Chiamonte, M.G. *et al.* (2003) Regulation and function of the interleukin 13 receptor  $\times 2$  during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J. Exp. Med.* 197, 687–701
- 37 Mentink-Kane, M.M. *et al.* (2004) IL-13 receptor  $\alpha 2$  down-modulate granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 586–590
- 38 Montesano, M.A. *et al.* (2002) Idiotypes expressed early in experimental *Schistosoma mansoni* infections predict clinical outcomes of chronic disease. *J. Exp. Med.* 195, 1223–1228
- 39 Chiamonte, M.G. *et al.* (2001) Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 34, 273–282
- 40 Booth, M. *et al.* (2004) Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- $\gamma$ , high TNF- $\alpha$ , or low RANTES, depending on age and gender. *J. Immunol.* 172, 1295–1303
- 41 Henri, S. *et al.* (2002) Cytokine Regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. *J. Immunol.* 169, 929–936
- 42 Andrade, Z.A. (2004) Schistosomal hepatopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 51–57
- 43 Vennervald, B.J. *et al.* (2004) Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. *Trop. Med. Int. Health* 9, 461–470
- 44 Vennervald, B.J. and Dunne, D.W. (2004) Morbidity in schistosomiasis: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 439–447
- 45 Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138–146
- 46 Xu, D. *et al.* (2003) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 Cells, leishmania major infection, and colitis in mice. *J. Immunol.* 170, 394–399
- 47 Carter, L.L. and Dutton, R.W. (1996) Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 336–342
- 48 Pearce, E.J. *et al.* (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159–166
- 49 Stadecker, M.J. (1999) The development of granulomas in schistosomiasis: genetic backgrounds, regulatory pathways, and specific egg antigen responses that influence the magnitude of disease. *Microbes Infect.* 1, 505–510
- 50 Hesse, M. *et al.* (2000) NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am. J. Pathol.* 157, 945–955
- 51 Patton, E.A. *et al.* (2001) Severe Schistosomiasis in the absence of Interleukin-4 (IL-4) is IL-12 independent. *Infect. Immun.* 69, 589–592
- 52 Gomez, D.E. *et al.* (1999) Expression of metalloproteinases (MMP-1 and MMP-2) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 9–13
- 53 Andrade, Z.A. *et al.* (1999) Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 87–93
- 54 Bina, J.C. and Prata, A. (2003) Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarandí. Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 211–216
- 55 Arap Siogok, T.K. *et al.* (1976) Morbidity in schistosomiasis mansoni in relation to intensity of infection: study of a community in Machakos, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25, 273–284
- 56 Quinnell, R.J. (2003) Genetics of susceptibility to human helminth infection. *Int. J. Parasitol.* 33, 1219–1231
- 57 Dessein, A.J. *et al.* (1999) Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 709–721
- 58 Marquet, S. *et al.* (1996) Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat. Genet.* 14, 181–184
- 59 Rodrigues, V. *et al.* (1999) Genetic control of Schistosome infections by the SM1 locus of the 5q31-q33 region is linked to differentiation of type 2 helper T lymphocytes. *Infect. Immun.* 67, 4689–4692
- 60 Secor, W.E. *et al.* (1996) Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1\*0201. *J. Infect. Dis.* 174, 1131–1135

## **APÉNDICE 3**

## Preliminar evaluation of cytokines in the hepatitis C-schistosomiasis co-infection

Clarice NL Morais, Bruno M Carvalho<sup>+++</sup>, Wladimir G Melo, Edmundo PA Lopes\*, Ana Lúcia C Domingues\*, Norma T Jucá\*, Wayner Souza, Frederico GC Abath<sup>++</sup>,  
Sílvia ML Montenegro<sup>+/++</sup>

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-240 Recife, PE, Brasil

\*Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Evaluation of hepatic fibrosis is usually performed by histopathological examination of biopsies. However, this is an invasive and potentially dangerous procedure. Several studies have proposed serum biological markers of hepatic fibrosis. This communication evaluates the use of serum cytokines as markers of hepatic fibrosis in hepatitis C, schistosomiasis, and co-infection.*

Key words: hepatitis C - cytokines - schistosomiasis - co-infection - fibrosis

Fibrosis is the major cause of mortality and morbidity related to schistosomiasis and hepatitis C (Strauss 2001). Microscopical examination of hepatic biopsy is the gold standard to stage fibrosis, however, it is an invasive procedure and is potentially dangerous. Thus, several studies have emerged in an attempt to develop non invasive methods to evaluate the stage of hepatic fibrosis (Myers et al. 2002, Poynard et al. 2005). The possible synergistic mechanisms present in the association between schistosomiasis and hepatitis C, and leading to severe hepatic disease remains unclear (Kamal et al. 2004).

The main objective of this preliminar study is to evaluate if serum levels of cytokines can be used as biological markers to predict severity of hepatic fibrosis in schistosomiasis and hepatitis C as isolated diseases or co-infections.

The following groups were composed for the study: hepatosplenic schistosomiasis patients (n = 03), hepatitis C patients (n = 23), and hepatitis C plus hepatosplenic schistosomiasis patients (n = 11). Hepatic biopsies, ultrasonography, stool exams, and blood tests for biological markers of fibrosis were performed. All patients were tested for HIV, hepatitis B, and antibodies against hepatitis C virus.

Diagnosis of hepatitis C patients was confirmed by detection of viral RNA (Zeuzem et al. 1994) and genotyping (Stuyver et al. 1996). The serum levels of interleukin (IL-13), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) were detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits supplied by R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, US, following the instructions of the supplier.

Statistical analysis was conducted using ANOVA and significance was assumed for a *p* value < 0.05.

We compared the IL-13 serum levels between groups, but the differences were not statistically significant (Fig. 1A). In contrast, the levels of serum TNF- $\alpha$  were significantly higher in the co-infected group in comparison to the hepatitis C group (*p* = 0.001) or the central group (*p* = 0.003, Fig. 1B). In addition, schistosomiasis patients showed higher TGF- $\beta$  serum levels than the co-infected patients (*p* = 0.05, Fig. 1C).

Few data are available about the immune response of patients co-infected with hepatitis C and schistosomiasis. IL-13 is considered to be the major fibrogenic mediator in murine schistosomiasis and recent studies in humans associated high levels of this cytokine with the development of more severe hepatic fibrosis (Ribeiro-de-Jesus et al. 2004), although this was not corroborated by our results, perhaps it may be due to the reduced sample size. Some studies have established a correlation between TNF- $\alpha$  serum levels in hepatitis C patients and the degree of liver inflammation while TGF- $\beta$  serum levels were correlated with liver fibrosis (Neuman et al. 2002). Other studies showed that schistosomiasis may downregulate the stimulatory effect of hepatitis C virus on Th1 cytokines and this may lead to chronicity of hepatitis C infection in co-infected patients (El Kady et al. 2004). However, our results showed that serum levels of TNF- $\alpha$ , a Th1 cytokine, were significantly higher in the co-infected group than hepatitis C group. Furthermore, schistosomiasis patients showed significantly higher serum levels of TGF- $\beta$ , a known mediator of fibrosis, than co-infected patients suggesting that TGF- $\beta$ , is downregulating the production of TNF- $\alpha$ .

As the literature on this subject is relatively scarce, this preliminary study contributes to a better understanding of the immunological mechanisms, fibrogenic process, and biological markers. These results suggests that immunoregulation of schistosomiasis-hepatitis C co-infection is different as far as the diseases are analysed separately.

Financial support: CNPq, Fiocruz

<sup>+</sup>Corresponding author: silvia@cpqam.fiocruz.br

<sup>++</sup>CNPq research scholarships

<sup>+++</sup>CNPq, Pibic/Fiocruz fellowship

Received 25 May 2006

Accepted 26 June 2006

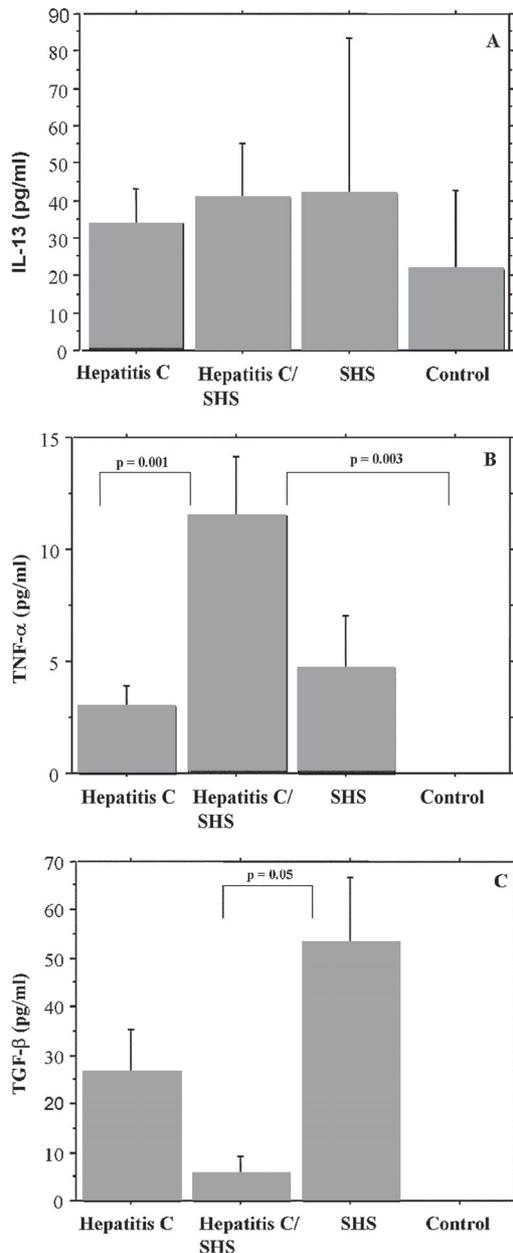


Fig. 1: serum levels of interleukin IL-13 (A), tumor necrosis factor TNF- $\alpha$  (B), and transforming growth factor TGF- $\beta$  (C) in patients with hepatitis C, hepatosplenic schistosomiasis (SHS) and the association of both diseases;  $p < 0.05$  was considered significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the technical staff of Serviço de Referência para Diagnóstico em Esquistossomose, CPqAM-Fiocruz, for the valuable help in this work.

## REFERENCES

- El-Kady IM, Lofty M, Badra G, El-Masry S, Waked I 2005. Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-18 and IFN- $\gamma$  cytokines pattern in patients with combined hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* infections. *Scand J Immunol* 61 (Suppl. 1): 87-91.
- Kamal SM, Graham CS, He Q, Bianchi L, Tawil AA, Rasenack JW, Khalifa KA, Massoud MM, Koziel MJ 2004. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *J Infect Dis* 189: 1140-1150.
- Myers RP, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poinard T 2002. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 97 (Suppl. 9): 2419-2425.
- Neuman MG, Benhamou JP, Bouliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le-Breton V, Le-Guludec G, Marcellin P 2002. Serum tumour necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  levels in chronic hepatitis C are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 17 (Suppl. 2): 108-117.
- Poinard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Ratziu V 2005. FibroTest-FibroSURE<sup>TM</sup>: towards a universal biomarker of liver fibrosis? *Expert Rev Mol Diagn* 5 (Suppl. 1): 15-21.
- Ribeiro-de-Jesus A, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, Almeida-de-Jesus A, Silva A, Santana LB, Pearce E, Carvalho EM 2004. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 72 (Suppl. 6): 3391-3397.
- Strauss E. 2001. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med. Trop* 34 (Supl. 1): 69-82.
- Stuyver L, Wyseur A, Arnhem W, Hernandez F, Maertens G 1996. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 34 (Suppl. 9): 2259-2266.
- Zeuzem S, Ruster B, Roth WK 1994. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplacor HCV) for detection of hepatitis C virus. *Z Gastroenterol* 32 (Suppl. 6): 342-347.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1**



## COMITÊ DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

**Título do Projeto:** "Avaliação da relação entre citocinas pró-fibróticas e marcadores bioquímicos com os graus de fibrose no complexo hepatite C e esquistossomose"

**Pesquisador responsável:** : Silvia Maria Lucena Montenegro

**Instituição onde se realizará o projeto:** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 44/03

### PARECER

O Comitê verificou que as modificações introduzidas na nova versão do projeto, isto nos objetivos quanto na metodologia, não resultaram em mudanças substanciais e representem implicações éticas, além das que já foram analisadas e atendidas anteriormente e assim considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em estão permanecem condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos

Recife, 06 de abril de 2005

*Ana Maria A. Santa*

Dr<sup>a</sup> Ana Maria Aguiar dos Santos



Médica  
Coordenação  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

## **ANEXO 2**

**FICHA CADASTRAL DE PACIENTES DO PROJETO HEPATITE C/ ESQUISTOSSOMOSE  
DOUTORADO SAÚDE PÚBLICA**

**GRUPO:** \_\_\_\_\_

1) Prontuário do paciente n°:

2) Nome:

3) Idade:                      Sexo:                      Raça: Branca ( ) Preta( ) Mulata( )

4) Endereço:

Fone:

5) Hepatite C:                      sim ( )                      não( )

	SIM	NÃO
Hemotransfusão		
Uso de seringas de vidro		
Tatuagem, piercings		
Acupuntura		
Promiscuidade sexual		
Internações hospitalares		
Procedimentos odontológicos		
Desconhecido		
Tratamento		

6) Esquistossomose: sim ( )                      não ( )

Tratamento:                      sim ( )                      não ( )                      Data:

Banho de rio                      sim ( )                      não ( )

7)USG: Grau de fibrose

Média fibrose

Padrão fibrose

Baço Longitudinal

Veia Porta

8) Exames laboratoriais:

Bilirrubinas

Eletroforese de proteínas

$\alpha$ -2 macroglobulina

Transaminases

Gama GT

Fosfatase alcalina

Ác. hialurônico

Hidroxirolina

Anti-HCV

Anti-HBc

Anti-HIV

HCV RNA

HCV genótipo

Plaquetas

Hemograma

TPAE

9) Parasitológico de fezes:

Hoffmann:

Kato-Katz:

10) Biópsia hepática:      sim ( )      não ( )

11) Hepatite B:              sim ( )      não ( )

12) Ingestão de álcool      sim ( )      não ( )

13) Presença de outras hepatopatias:      sim ( )      não ( )

14) Transplantes/ uso de imunossupressores:      sim ( )      não ( )

15) Exame físico: Aranhas vasculares      sim( )      não( )