

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* AFETAM A
SUSCEPTIBILIDADE DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA A
Leishmania (Leishmania) amazonensis *IN VITRO***

GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

BELO HORIZONTE

2019

GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

**DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* AFETAM A
SUSCEPTIBILIDADE DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA A
Leishmania (Leishmania) amazonensis *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Déborah Aparecida Negrão-Corrêa

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Norma Melo

BELO HORIZONTE

2019

043

Camelo Júnior, Genil Mororó Araújo.

Diferentes fases da infecção por *Schistosoma mansoni* afetam a susceptibilidade de macrófagos derivados de medula óssea a *Leishmania (Leishmania) amazonensis in vitro* [manuscrito] / Genil Mororó Araújo Camelo Júnior. – 2019.

106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Déborah Aparecida Negrão-Corrêa. Coorientadora: Profa. Dra. Maria Norma Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Esquistossomose. 3. Leishmaniose. 4. Coinfecção. 5. Resposta imune. I. Negrão-Corrêa, Déborah Aparecida. II. Melo, Maria Norma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Genil Mororó Araújo Camelo Júnior401/2019/14
entrada
1º/2018
2018653622

Às quatorze horas do dia 24 de outubro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Diferentes fases da infecção por *Schistosoma mansoni* afetam a susceptibilidade de macrófagos derivados de medula óssea a *Leishmania (Leishmania) amazonensis in vitro*”** área de concentração: **Imunoparasitologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa	UFMG	Aprovado
Dra. Leda Quércia Vieira	UFMG	Aprovado
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG	Aprovado
Dra. Maria Norma Melo	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovado
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 24 de outubro de 2019.

Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa [Assinatura]
(Orientadora)Dra. Leda Quércia Vieira [Assinatura]Dr. Ricardo Toshio Fujiwara [Assinatura]Dra. Maria Norma Melo [Assinatura]
(Coorientadora)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[Assinatura]
Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia – ICB/UFMG

Profa. Dra. Déborah Aparecida Negrão-Corrêa

Laboratório de Biologia de *Leishmania* – ICB/UFMG

Profa. Dra. Maria Normal Melo

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS)

Dedico este trabalho aos que resistem

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Prof^a Déborah Aparecida Negrão-Corrêa por acolher-me em seu laboratório e oferecer todo o suporte que precisei para colocar minhas ideias em prática. A sua orientação foi muito valiosa, de verdade, e fez um protozoologista mirim se encantar pela helmintologia. Da mesma forma, agradeço à Prof^a Maria Norma Melo pela coorientação, pois foi graças a ela que foi possível trazer um protozoário para dentro de um laboratório de imunologia de helmintos. Espelho-me muito em vocês e sonho em um dia ser um profissional à altura.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, nas pessoas da Prof^a Daniella Castanheira Bartholomeu, Sumara Aparecida Guilherme e Sibele Abreu. Igualmente, agradeço aos demais professores do programa pela contribuição de todos na minha formação como parasitologista. Foi esse programa que me fez sair da conforto da minha terra para me aventurar em busca de crescimento profissional e pessoal e me fez crescer tanto desde quando vim para cá. Agradeço também a todos os outros que, de uma forma ou outra, colaboraram com a realização do meu projeto.

A todos os integrantes do Laboratório de Esquistossomose e Helmintologia, inclusive os agragados, eu só tenho a dizer obrigado. Não vou citar o nome de todo mundo porque teria que ser um capítulo inteiro, mas saibam que, sem vocês, eu não teria conseguido fazer nada. Vocês são bem mais do que colegas de laboratório para mim. Obrigado por todas as festinhas e suporte com os experimentos. Escolher esse laboratório para fazer meu mestrado me fez muito feliz, e vocês são responsáveis por isso. Espero ainda tirar muitas fotos com vocês e o Pellegrino. Sou muito grato também aos meus amigos da turma do mestrado. Fico feliz por ter conhecido essa gente maravilhosa, com quem dividi uns meses bem puxados logo depois de me mudar. Independentemente do caminho que tomemos daqui em diante, eu sei que fiz amigos que vou levar comigo pelo tempo que for, aonde eu for. Seja nas reuniões para revisar antes das provas ou nas dormidas na casa um do outro depois de festa; nos fins de semana passados no laboratório de aula prática ou nas conversas em um bar com batata frita sabor frango; ouvindo meus áudios tarde da noite por causa de experimento errado ou desafinando no caraoquê, grande parte das memórias boas que tenho aqui tenho por causa de vocês. Obrigado a todos vocês por me ensinarem a ter um novo lugar para chamar de lar.

Não posso deixar de agradecer à minha família, meus pais, Nati e Genil, minhas irmãs, Michelle e Karen, e minhas sobrinhas, Paola e Laís. Ficar longe é difícil, mas sempre

sei que posso contar com o suporte de vocês quando precisar. E vocês sabem que podem contar com o meu do mesmo jeito. Amo muito todos vocês. Espero que eu sempre possa corresponder às expectativas que vocês têm de mim. Aos meus amigos de Fortaleza e adjacências, assim como os de antes longe que se tornaram vizinhos, obrigado por nos manterem firmes mesmo com toda a distância por esse tempo todo. Sei que os laços que construí com vocês não se quebram facilmente assim, e fico muito feliz em ver que nós continuamos com a mesma amizade de sempre toda vez que estou numa casa ou em outra.

Por fim, gostaria de agradecer imensamente ao que sobrou da minha sanidade mental por não ter desistido de mim. Segura firme porque ainda vem o doutorado por aí.

“Só a ignorância aceita e a indiferença tolera o reinado da mediocridade.”

José de Alencar

RESUMO

A esquistossomose e a leishmaniose são classificadas como doenças tropicais negligenciadas e afetam principalmente populações de baixa renda em áreas tropicais com difícil acesso a serviços de saúde. Além disso, a patologia de ambas as doenças é diretamente ligada à resposta imune do hospedeiro. *Schistosoma mansoni*, o agente etiológico da esquistossomose no Brasil, induz três diferentes respostas durante seu ciclo de vida: a fase pré-postural é caracterizada por uma resposta Th-1, enquanto as respostas nas fases aguda e crônica são predominantemente Th-2 e regulatória, respectivamente. Por sua vez, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) corresponde a um espectro de doenças, indo desde úlceras localizadas e autolimitadas, até lesões múltiplas e desfigurantes. Uma forte resposta Th-1 é associada ao controle de *Leishmania* sp., mas leva a extenso dano tecidual. De outro lado, respostas Th-2 e regulatórias, ao passo que controlam o dano provocado pela resposta Th-1, favorecem o crescimento intracelular do parasito. *L. (Leishmania) amazonensis* é uma das diversas espécies que causam LTA, e suas regiões endêmicas se sobrepõem às áreas onde há transmissão de *S. mansoni*. Alguns trabalhos abordaram a coinfeção entre *S. mansoni* e *Leishmania* sp., evidenciando aumento na susceptibilidade de células, proeminência de resposta regulatória e pior resposta ao tratamento. No entanto, nenhum estudo até agora investigou as consequências de cada fase da esquistossomose no parasitismo intracelular de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos. Camundongos BALB/c não infectados e com 3, 8 ou 12 semanas de esquistossomose foram eutanasiados para recuperação de células da medula óssea e cultivo na presença de meio condicionado de células L929 para induzir a diferenciação de macrófagos. Macrófagos derivados da medula óssea dos diferentes grupos experimentais foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*, na proporção de 10 promastigotas por célula. Foram, também, mantidas células não infectadas. As lamínulas foram fixadas e coradas com 48 e 72 horas após infecção. Sobrenadante de cultura foram coletados com 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Mesmo que a porcentagem de macrófagos infectados não tenha diferido entre os grupos, macrófagos recuperados de animais na fase aguda da esquistossomose tiveram número maior de amastigotas intracelulares, acompanhada de menor produção de óxido nítrico por essas células. Não foram achadas diferenças na atividade de arginase nem nos níveis de IL-10. Durante a fase pré-postural, o sobrenadante de macrófagos teve maiores concentrações de TGF- β e CCL5, enquanto a infecção na fase aguda levou apenas a um aumento de TGF- β . A infecção crônica promoveu aumento de TGF- β e CXCL2, mas níveis menores de CCL5 que no grupo controle. Esses resultados claramente mostram que todas as fases da infecção de *S. mansoni* são capazes de influenciar a maturação de macrófagos e como essas células respondem à infecção *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*. Efeitos a longo prazo na LTA também podem acontecer devido a recrutamento e ativação divergentes de células por macrófagos infectados. Juntos, esses resultados mostram a importância de estudos sobre a coinfeção por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis*, já que os mecanismos envolvidos nesse processo ainda têm de ser mais bem explorados.

Palavras-chave: esquistossomose, leishmaniose, coinfeção, resposta imune

ABSTRACT

Schistosomiasis and leishmaniasis are classified as neglected tropical diseases and affect mostly tropical, low-income populations that lack access to proper health care. As a further matter, both diseases have their pathogenesis directly linked to the host's immune response. *Schistosoma mansoni*, the etiologic agent of schistosomiasis in Brazil, elicits three different immune response types during its life cycle: the pre-postural phase is characterized by a Th-1 immune response, while acute and chronic phases are predominantly marked by a Th-2 and a regulatory response, respectively. On its turn, American tegumentary leishmaniasis (ATL) corresponds to a spectrum of diseases, ranging from localized, self-healing ulcers to multiple, disfiguring lesions. A strong Th-1 response is associated with *Leishmania* sp. control, but leads to extensive tissue damage. Au contraire, Th-2 and regulatory responses, while limiting Th-1-driven damage, favour the parasite's intracellular growth. *L. (Leishmania) amazonensis* is one of several *Leishmania* species that cause ATL, and its endemic regions overlap with *S. mansoni* transmission areas. Some works have addressed *S. mansoni* and *Leishmania* sp. coinfection and have shown enhanced cell susceptibility, preeminence of a regulatory immune response and worse response to treatment. However, no study up until now has investigated the consequences of each phase of schistosomiasis in the intracellular parasitism of *L. (L.) amazonensis* in macrophages. BALB/c mice uninfected or after 3, 8 and 12 weeks of *S. mansoni* infection were euthanized in order to recover bone marrow cells, which were cultured in the presence of L929 conditioned medium to induce macrophage differentiation. Macrophages were then plated on round coverslips in 24-well plates and infected with *L. (L.) amazonensis* stationary phase promastigotes, 10 promastigotes per cell. Replicas from each experimental group were kept uninfected. Coverslips were fixed and stained at 48 and 72 hours post-infection. Culture supernatants were collected with 24, 48 and 72 hours post-infection. Although the percentage of infected macrophages showed no difference between groups, macrophages recovered from animals with acute schistosomiasis had an increased number of intracellular amastigotes, accompanied by lower nitric oxide production. No differences were found in arginase activity and IL-10 levels. During pre-postural infection, macrophages showed higher concentrations of TGF- β and CCL5 in culture supernatant, while acute infection lead only to higher TGF- β levels. Chronic infection had increased TGF- β and CXCL2 concentrations, while its CCL5 levels were lower than the control group. These results clearly show that all *S. mansoni* infection phases differently influence macrophage maturation and how these cells respond to *L. (L.) amazonensis* infection *in vitro*. Long-term effects on ATL may also happen due to divergent cell recruitment and activation by infected macrophages. Together, these results further show the importance of studies revolving around *S. mansoni* and *L. (L.) amazonensis* coinfection, for the mechanisms involved in this process are yet to be better understood.

Keywords: schistosomiasis, leishmaniasis, coinfection, immune response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global das espécies causadores de esquistossomose.....	16
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Schistosoma</i> sp.	18
Figura 3: Diferentes perfis de resposta imune no decorrer da infecção por <i>S. mansoni</i>	19
Figura 4: Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar em 2016	24
Figura 5: Ciclo de <i>Leishmania</i> sp.	25
Figura 6: Espectro de doenças na leishmaniose tegumentar.....	28
Figura 7: Diferentes perfis de ativação de macrófagos, seus respectivos estímulos e expressão de receptores, citocinas, quimiocinas e moléculas efetoras	32
Figura 8: Distribuição geográfica da esquistossomose e da leishmaniose tegumentar no Brasil	36
Figura 9: Planejamento da infecção por <i>S. mansoni</i> (A) de grupos utilizados para recuperação de macrófagos e infecção <i>in vitro</i> com <i>L. amazonensis</i> e tempos de coleta de material para análise (B)	44
Figura 10: Porcentagem de macrófagos de medula óssea recuperados em diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i> infectados <i>in vitro</i> por <i>L. amazonensis</i>	49
Figura 11: Susceptibilidade de macrófagos diferenciados de medula óssea à infecção por <i>L. amazonensis</i> durante diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i>	51
Figura 12: Produção de CXCL2 por macrófagos derivados de monócito de medula	53
Figura 13: Produção de CCL5 por macrófagos derivados de monócito de medula	54
Figura 14: Produção de CCL24 por macrófagos derivados de monócito de medula	55
Figura 15: Produção de IL-10 por macrófagos derivados de monócito de medula	56
Figura 16: Produção de TGF- β por macrófagos derivados de monócitos de medula.....	56
Figura 17: Atividade de arginase por macrófagos derivados de monócitos de medula.....	57
Figura 18: Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de monócito de medula	58
Figura 19: Resumo da produção diferencial de moléculas efetoras, citocinas e quimiocinas, bem como número de amastigotas no tempo de 72 horas após infecção por <i>L. amazonensis</i> , em macrófagos diferenciados de medula óssea em diferentes fases de infecção por <i>S. mansoni</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – análise de variância (*analysis of variance*)
- Arg – arginase
- BSA – albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
- CCL – ligante de quimiocina com motivo C-C (*chemokine [C-C motif] ligand*)
- CD – agrupamento de diferenciação (*cluster of differentiation*)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CTLA-4 – proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)
- CXCL – ligante de quimiocina com motivo C-X-C (*chemokine [C-X-C motif] ligand*)
- DALY – ano de vida ajustado por incapacidade (*disability-adjusted life years*)
- ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ERK – quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)
- GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- γ - interferon gama
- Ig - imunoglobulina
- IL – interleucina
- IL-12R β 2 – receptor de IL-12 β 2 (*IL-12 receptor β 2*)
- iNOS – óxido nítrico sintase induzida (*inducible nitric oxide synthase*)
- INPEG – inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthoses
- LABEIH – Laboratório de Esquistossomose e Imunohelminthologia
- LCDA – leishmaniose cutânea difusa anérgica
- LCL – leishmaniose cutânea localizada
- LD – leishmaniose disseminada
- LM – leishmaniose mucosa
- LNFP III - lacto-N-fucopentaose III
- LTA – leishmaniose tegumentar americana
- MEM – meio essencial mínimo
- MOI – multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*)
- M ϕ – macrófago
- NF- κ B – fator nuclear κ B (*nuclear factor κ B*)

NK – célula *natural killer*

NLR – receptor do tipo NOD (*NOD-like receptor*)

NO – óxido nítrico (*nitric oxide*)

PBS – tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

TGF- β – fator de crescimento tumoral β (*tumor growth factor β*)

Th – T auxiliar (*T helper*)

TLR – receptor do tipo *toll* (*toll-like receptor*)

TNF- α – fator de necrose tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

Treg – célula T regulatória

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Esquistossomose	16
2.1.1	Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	17
2.1.2	Imunopatologia da esquistossomose	19
2.2	Leishmaniose tegumentar americana.....	23
2.2.1	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	24
2.2.2	Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana	27
2.2.3	Imunopatologia e imunidade celular em resposta a <i>Leishmania</i> sp.	31
2.2.3.1	Resposta de macrófagos à infecção por <i>Leishmania</i> sp.	31
2.3	Influência da infecção por <i>S. mansoni</i> em comorbidades.....	34
2.3.1	Coinfecção por <i>S. mansoni</i> e <i>Leishmania</i> sp.	35
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	OBJETIVO	41
4.1	Objetivo geral	41
4.2	Objetivos específicos	41
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1	Animais.....	42
5.2	Parasitas	42
5.3	Delineamento experimental.....	42
5.4	Recuperação de macrófagos	44
5.5	Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	45
5.6	Avaliação de parasitismo e perfil de resposta de macrófagos.....	46
5.6.1	Dosagem de quimiocinas e citocinas	46
5.6.2	Ensaio de atividade de arginase	47
5.6.3	Dosagem de óxido nítrico.....	48
5.7	Análise estatística	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	Susceptibilidade de macrófagos de animais com <i>S. mansoni</i> à infecção por <i>L. amazonensis</i>	49
6.2	Ativação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com	

diferentes períodos de esquistossomose frente à infecção por <i>L. amazonensis</i>	52
7 DISCUSSÃO	60
7.1 A infecção por <i>S. mansoni</i> durante a fase aguda diminui a capacidade de macrófagos de medula óssea de controlarem a infecção por <i>L. amazonensis</i>	61
7.2 Diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i> modulam a capacidade de macrófagos de induzir resposta adaptativa	64
7.3 A expressão de quimiocinas e capacidade de macrófagos em recrutar células são modificadas durante a infecção por <i>S. mansoni</i>	66
8 CONCLUSÃO	71
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A	105

1 INTRODUÇÃO

Entre as enfermidades classificadas como doenças tropicais negligenciadas, se encontram a esquistossomose e a leishmaniose tegumentar americana, as quais ainda causam grande morbidade no Brasil (WHO, 2015; MARTINS-MELO et al., 2018). No País, o agente etiológico da esquistossomose é o trematódeo *Schistosoma mansoni*, enquanto a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, incluindo *L. (Leishmania) amazonensis* (WEERAKOON et al., 2015; SCORZA et al., 2017).

Durante seu ciclo de vida, *S. mansoni* possui três fases distintas em seu hospedeiro vertebrado, caracterizadas por diferentes perfis de resposta imune (DUNNE & COOKE, 2005). Durante a fase pré-postural, até as quatro primeiras semanas de infecção, antígenos das fases imaturas do helminto promovem uma resposta predominantemente Th-1 (MENSON & WILSON, 1989; REYNOLDS & HARN, 1992; EL RIDI et al., 2010). A partir do início da oviposição, antígenos dos ovos acarretam mudança para um perfil de resposta Th-2, com pico entre a oitava e a nona semana de infecção (OKANO et al., 1999a; EVERTS et al., 2009). Paralelamente, também se estabelece uma resposta regulatória, majoritária a partir da décima primeira semana, responsável por modular as respostas Th-1 e Th-2, levando a uma patologia mais branda na fase crônica da infecção (HOFFMANN et al., 2000; HESSE et al., 2004; TAYLOR et al., 2006).

Por sua vez, *Leishmania* sp. são parasitos intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, e sua sobrevivência está intimamente relacionada ao perfil de ativação dessas células (LAWYER et al., 1990; SCOTT & NOVAIS, 2016; ROMANO et al., 2017). A resposta imune do hospedeiro é crítica para a determinação da forma clínica da leishmaniose tegumentar, pois, ao mesmo tempo que respostas pró-inflamatórias controlam o crescimento do parasito, causam danos teciduais; por outro lado, respostas anti-inflamatórias e regulatórias, que modulam o dano tecidual, são favoráveis ao crescimento intracelular de *Leishmania* sp. (FARIA et al., 2005; INIESTA et al., 2002; FARIA et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2010) A incapacidade de montar uma resposta celular efetiva está associada a uma forma grave de LTA, a leishmaniose difusa, principalmente causada por *L. (L.) amazonensis* (BARRAL et al., 1991; BOMFIM et al., 1996; CAMPANELLI et al., 2010).

Devido à cronicidade da infecção e sua capacidade de induzir diferentes perfis de resposta imune, já foi mostrado que *S. mansoni* é capaz de afetar a evolução de doenças inflamatórias crônicas, como esclerose múltipla, diabetes e alergias, além de outras

parasitoses, como malária (COOKE et al., 1999; LA FLAMME et al., 2003; SOKHNA et al., 2004; RESENDE et al., 2019). No entanto, mesmo que existam registros de populações coinfectadas por *S. mansoni* e espécies dermatrópicas de *Leishmania* sp. (O'NEAL et al., 2007; NEWLOVE et al., 2011; AZEREDO-COUTINHO et al., 2016; MIRANDA, 2018), as consequências e os mecanismos envolvidos nessa coinfeção ainda são relativamente pouco conhecidos.

Os poucos estudos realizados em populações humanas sugerem que a coinfeção *Schistosoma/Leishmania* causa piora na resposta terapêutica à LTA (O'NEAL et al., 2007; AZEREDO-COUTINHO et al., 2016). Além disso, experimentos *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico de indivíduos coinfectados indicam a ativação de resposta com perfil regulatório frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* sp. ou infecção de *L. (Viannia) braziliensis* (BAFICA et al., 2011; BAFICA et al., 2012; LOPES et al., 2014; LOPES et al., 2018; LOPES et al., 2019). Os dados obtidos em coinfeções entre *S. mansoni* e *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* realizadas em modelos experimentais murinos confirmam a diminuição da eficiência do tratamento para LTA, além da ocorrência de lesões maiores e diminuição na capacidade de macrófagos em controlar a infecção *in vitro* (COELHO et al., 1980; LA FLAMME et al., 2002; YOLE et al., 2007; KHAYEKA-WANDABWA et al., 2013).

No entanto, essas alterações aparentam ser dependentes da fase da infecção por *S. mansoni*, do fundo genético do modelo experimental, carga parasitária e da espécie de *Leishmania* em estudo, gerando trabalhos que mostram ausência de variação na patologia por esse parasito (YOSHIDA et al., 1999; KHAYEKA-WANDABWA et al., 2013). Desta forma, o presente trabalho utilizou macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos BALB/c em diferentes fases da infecção por *S. mansoni* para avaliar sua influência na resposta a *L. amazonensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A esquistossomose e as leishmanioses se enquadram entre um grupo de doenças determinadas como doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2015). Essas enfermidades afetam, majoritariamente, pessoas de baixa renda, com dificuldade de acesso a serviços de saúde, em regiões de pouco saneamento, com más condições de moradia e ocorrência de vetores.

2.1 Esquistossomose

A esquistossomose é responsável por mais de 2,5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) mundialmente, causando mais de 24000 mortes em 2016 (WHO, 2016a; WHO, 2018a). Essa doença é causada várias espécies de parasitos do gênero *Schistosoma* (figura 1), que inclui as espécies *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni*, somente esta última ocorrendo no Brasil (GRYSEELS, 2012; COLLEY *et al.*, 2014; WEERAKOON *et al.*, 2015).

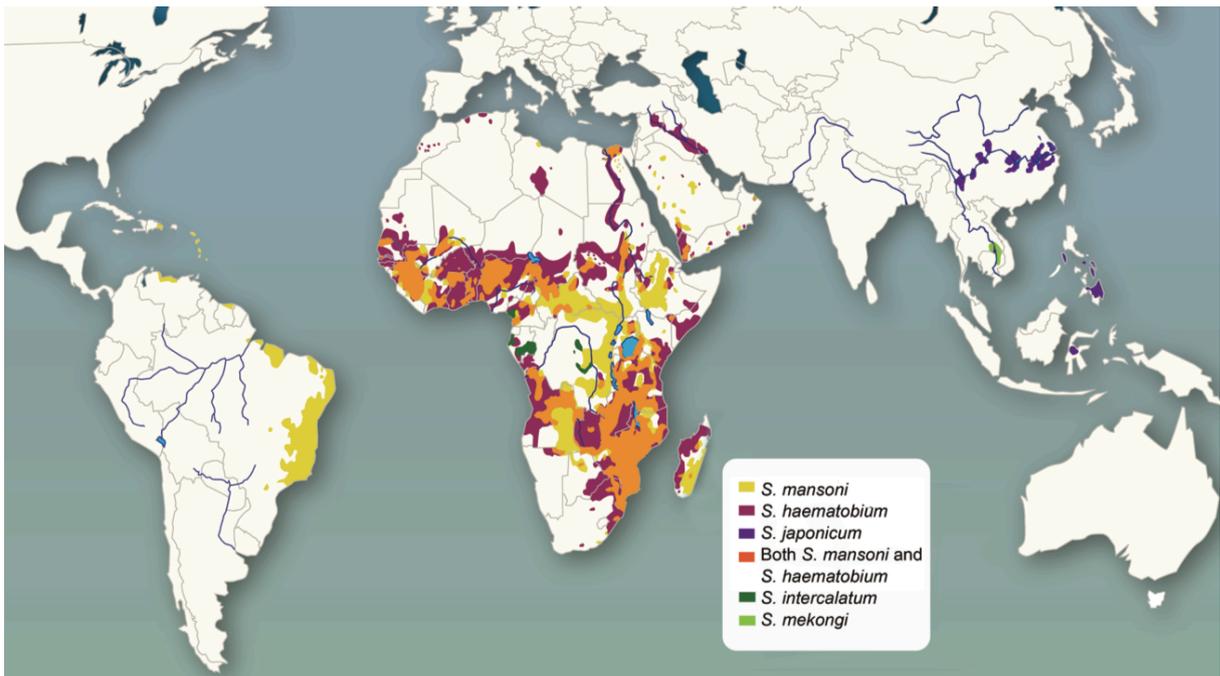


Figura 1: Distribuição global das espécies causadoras de esquistossomose. Fonte: WEERAKOON *et al.*, 2015.

O programa de controle da esquistossomose, adotado em áreas endêmicas

brasileiras, é baseado principalmente no diagnóstico e tratamento com Praziquantel e tem sido responsável por redução da prevalência da infecção em cerca de 50% e de 46% da morbidade, avaliada por DALYs, entre o período de 1990 e 2016 (CASAVECHIA *et al.*, 2018; MARTINS-MELO *et al.*, 2018). Apesar disto, a esquistossomose é responsável por 21,5% de DALYs ocasionados por doenças tropicais negligenciadas no país, sendo a principal causa de morbidade no Estado de Minas Gerais dentre esse grupo de patologias (MARTINS-MELO *et al.*, 2018).

Inquérito recente estima que a prevalência da esquistossomose no Brasil é em torno de 0,99% (KATZ, 2018). No entanto, é bastante provável que esse número esteja subestimado por falta de sensibilidade dos testes diagnósticos utilizados, principalmente em populações com baixa carga parasitária (COLLEY *et al.* 2017; CASAVECHIA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; MARTINS-MELO *et al.*, 2018). Fatores como migração interna, falta de saneamento e distribuição dos hospedeiros intermediários são responsáveis pela manutenção e expansão de focos de transmissão (MARTINS-MELO *et al.*, 2018).

2.1.1 Ciclo de vida de *S. mansoni*

O parasito *S. mansoni* apresenta ciclo do tipo heteroxênico, com a participação de hospedeiros vertebrados e invertebrados (figura 2). Quando ovos são eliminados nas fezes dos hospedeiros vertebrados e atingem corpos hídricos, ocorre a eclosão de miracídios. Estes penetram em caramujos susceptíveis, algumas espécies do gênero *Biomphalaria*, e tornam-se esporocistos, que maturam e, a partir de multiplicação assexuada, liberam cercárias, processo dependente de condições como temperatura e luminosidade (WOLMARANS *et al.*, 2002; GRYSEELS, 2012; COLLEY *et al.*, 2014).

A infecção dos hospedeiros vertebrados, mamíferos, ocorre pela penetração de cercárias na pele (GRYSEELS, 2012; COLLEY *et al.*, 2014). Durante a penetração, as cercárias perdem sua cauda bifurcada e tornam-se esquistossômulos, passando por mudanças bioquímicas e morfológicas (HOCKLEY & MCLAREN, 1973; GOBERT *et al.*, 2010). A migração dos esquistossômulos pela pele é facilitada pela secreção de enzimas proteolíticas (HE *et al.*, 2005) e ocorre de forma direcionada a vasos sanguíneos, em resposta a gradiente de concentração de componentes como D-glicose e L-arginina (HAAS *et al.*, 2002).

Uma vez atingindo a circulação, ocorre a passagem dos esquistossômulos pelos pulmões e coração até as veias do sistema porta hepático, onde estes passam por mais mudanças durante a maturação dos vermes adultos (BARBOSA *et al.*, 1978; WILSON *et al.*,

1978; WILSON, 2009; GOBERT *et al.*, 2010; JEREMIAS *et al.*, 2017). No período de migração dos esquistossômulos, ocorrem algumas manifestações clínicas, como dermatite, febre, fadiga, mialgia, dores de cabeça e tosse não produtiva (ROSS *et al.*, 2007; GRYSEELS, 2012).

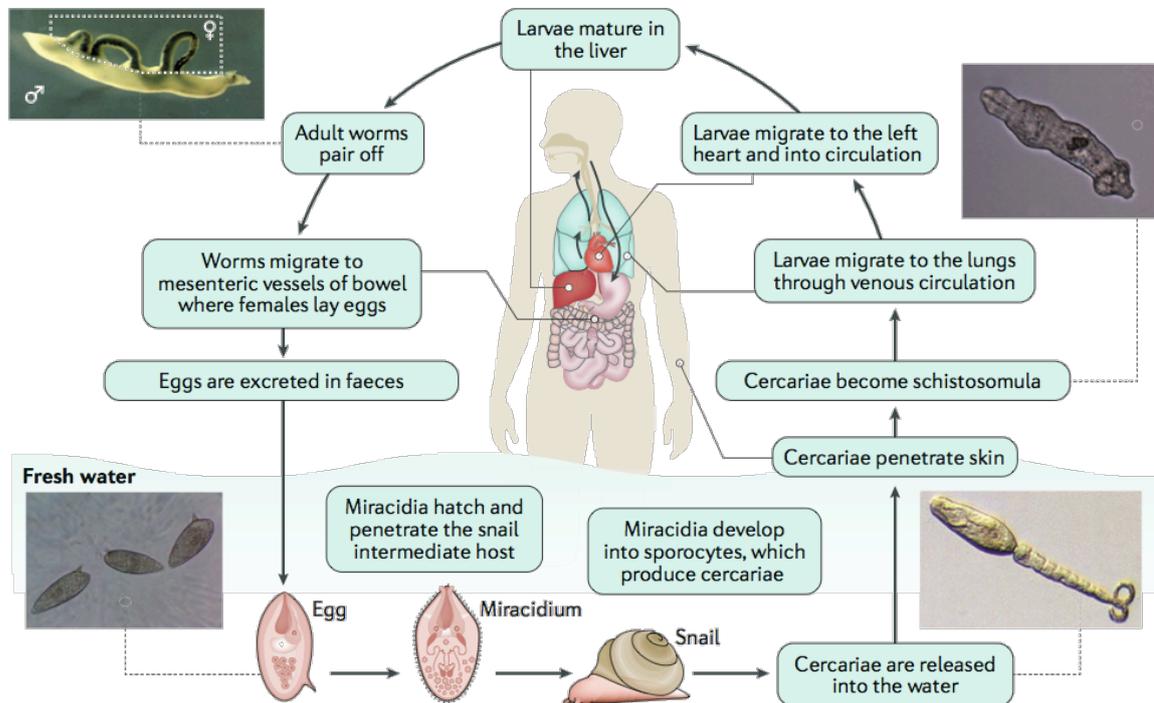


Figura 2: Ciclo de vida de *Schistosoma* sp. Fonte: MCMANUS *et al.*, 2018.

Entre o sétimo e o décimo primeiro dia após a infecção, os esquistossômulos chegam ao fígado e, tornando-se adultos, acasalam-se nas veias do sistema porta hepático ao 27º dia (ARMSTRONG, 1965; BARBOSA *et al.*, 1978; WILSON *et al.*, 1978; WILSON, 2009). As fêmeas fecundadas realizam a oviposição principalmente no ramo inferior das veias mesentéricas, e parte dos ovos aderem ao endotélio, atravessam a parede intestinal e são eliminados nas fezes do hospedeiro (BRENER, 1956; GRYSEELS, 2012).

O processo de eliminação leva aproximadamente sete dias, dando tempo ao amadurecimento dos miracídeos (GRYSEELS, 2012; TURNER *et al.*, 2012; HAMS *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2014). Fatores associados à resposta imune do hospedeiro são de grande importância para a eliminação dos ovos, sendo realizada, preferencialmente, em regiões de placas de Peyer (TURNER *et al.*, 2012; HAMS *et al.*, 2013; SCHWARTS & FALLON, 2018). Com o comprometimento da resposta imune, ocorre menor eliminação de ovos nas fezes (TURNER *et al.*, 2012; HAMS *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2012; HAMS *et al.*, 2013; SCHWARTS & FALLON, 2018).

No entanto, nem todos os ovos conseguem atravessar a parede intestinal ou sequer aderir às veias mesentéricas, sendo levados pela circulação venosa, atingindo outros órgãos do corpo (GRYSEELS, 2012; TURNER *et al.*, 2012; HAMS *et al.*, 2013). A retenção de ovos no hospedeiro vertebrado é a causa de maior parte da patologia da esquistossomose, de natureza imune, que será abordada em mais detalhes a seguir (GRYSEELS, 2012; HAMS *et al.*, 2013).

2.1.2 Imunopatologia da esquistossomose

Durante o curso da infecção por *S. mansoni*, é possível identificar três fases distintas da doença, a fase pré-postural, a fase aguda pós-postural e a fase crônica. Essas três etapas têm sido associadas a perfis de resposta imune diferenciados (figura 3).

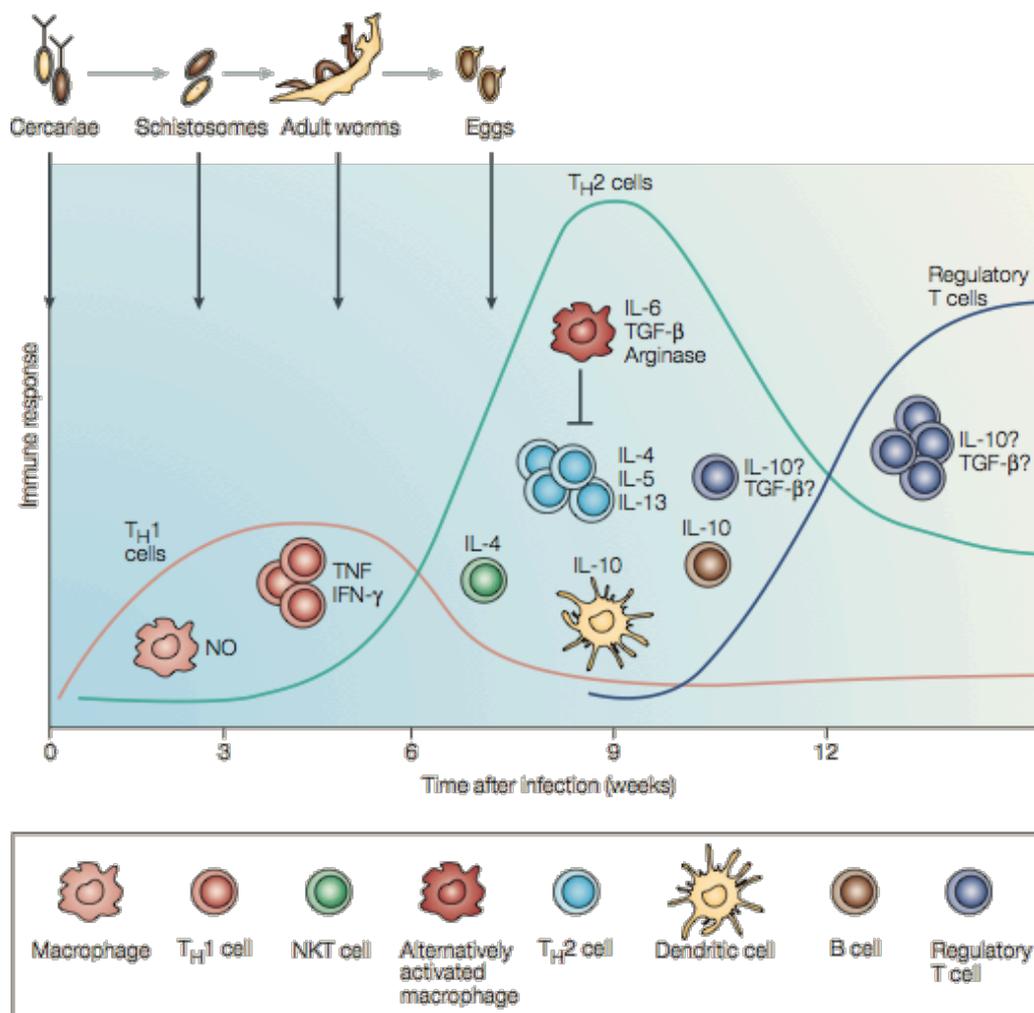


Figura 3: Diferentes perfis de resposta imune no decorrer da infecção por *S. mansoni*.
Fonte: DUNNE & COOKE, 2005.

A fase pré-postural ocorre durante as quatro ou cinco primeiras semanas da

infecção, que inclui a penetração do parasito através da pele, migração pelo pulmão e estabelecimento de adultos no sistema porta (DEAN & MANGOLD, 1992; DUNNE & COOKE, 2005). A migração e maturação do trematódeo no hospedeiro promove uma resposta predominantemente Th-1, com pico por volta da terceira semana pós-infecção (MENSON & WILSON, 1989; DUNNE & COOKE, 2005).

Alguns estudos já evidenciaram que IFN- γ (JAMES *et al.*, 1990), uma citocina pró-inflamatória, e antígenos excretados e secretados de esquistossômulos (JAMES *et al.*, 1990; EL RIDI *et al.*, 2010) foram capazes de ativar classicamente macrófagos a matarem esquistossômulos *in vitro*, aumentando expressão de TNF- α e espécies reativas de oxigênio por essas células. *In vivo*, estimulação com antígenos de esquistossômulos também aumentou a produção de IFN- γ , IL-17 e espécies reativas de oxigênio em cultura de células de baço (MENSON & WILSON, 1989; REYNOLDS & HARN, 1992; EL RIDI *et al.*, 2010). Ao mesmo passo, a vacinação com cercárias irradiadas foi capaz de promover uma resposta Th-1, além de diminuir o número de vermes adultos, ovos retidos e tamanho do fígado de animais infectados (REYNOLDS & HARN, 1992). Esses dados sugerem que a resposta pró-inflamatória, predominantemente Th-1, está envolvida na resistência e controle nos períodos iniciais da infecção por *S. mansoni*.

Para prevenir morte mediada pela resposta Th-1, um dos mecanismos de evasão do parasito envolve a secreção de molécula homóloga à prostaglandina D₂, a qual funciona como indutora de uma resposta Th-2 (MATSUOKA *et al.*, 2000). Camundongos deficientes no receptor para essa molécula apresentam menor carga parasitária e número de ovos retidos (ANGELI *et al.*, 2001; HERVÉ *et al.*, 2003).

Com o início da oviposição, por volta da sexta semana pós-infecção, tem início a fase aguda pós-postural. Ela é caracterizada pela modificação para uma resposta de perfil Th-2, atingindo seu pico de intensidade por volta da oitava e nona semana de infecção (DUNNE & COOKE, 2005; HAMS *et al.*, 2013). O reconhecimento de antígenos excretados e secretados dos ovos se dá, em parte, por TLR2 e TLR4 (MUKHERJEE *et al.*, 2016; MOTRAN *et al.*, 2018). Apesar dessas vias serem associadas a respostas de perfil Th-1, foi mostrado que ocorre supressão da produção de IL-12 em células dendríticas pela fosforilação de ERK (AGRAWAL *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2003). Outros antígenos, como α -1 e LNFPIII, principalmente pela sua porção de carboidratos, sinalizam via receptores de manose e lectinas e induzem polarização para uma resposta Th-2 (OKANO *et al.*, 1999a; EVERTS *et al.*, 2009, WHITE & ARTAVANIS-TSAKONAS, 2012; HAMS *et al.*, 2013). A indução da resposta do Th-2 é essencial para que ocorra uma resposta

inflamatória granulomatosa ao redor dos ovos do parasito que ficam retidos nos tecidos do hospedeiro (HAMS *et al.*, 2013).

Como características de uma resposta de perfil Th-2, na fase aguda da esquistossomose há aumento de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, além de ocorrer eosinofilia e produção de IgE (OKANO *et al.*, 1999b; OKANO *et al.*, 2001; PEARCE & MACDONALD, 2002; PEARCE *et al.*, 2004; DUNNE & COOKE, 2005; EVERTS *et al.*, 2009). Esse ambiente favorece a ativação alternativa de macrófagos, os quais participam na deposição de colágeno ao redor dos granulomas, além de recrutar e ativar fibroblastos (HERBERT *et al.*, 2001; HESSE *et al.*, 2001; PEARCE & MACDONALD, 2002; WYNN & BARRON, 2010; HAMS *et al.*, 2013; SCHWARTS & FALLON, 2018). Esse tipo de resposta é de importância para que os ovos cheguem ao lúmen intestinal e alcancem o exterior, mas é a principal causa da patologia da esquistossomose nessa fase por conta de ovos retidos em tecidos (GRYSEELS 2012; HAMS *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2014; SCHWARTS & FALLON, 2018).

As características dos granulomas variam de acordo com o órgão em que se localizam (WEINSTOCK & BOROS, 1983; HAMS *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2017; SCHWARTS & FALLON, 2018). Os granulomas de fase aguda no fígado são caracterizados por serem mais celulares, com um infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos, enquanto os intestinais apresentam mais macrófagos, mas menos eosinófilos e linfócitos (HAMS *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2017; SCHWARTS & FALLON, 2018).

O dano à parede do intestino, causado pela passagem dos ovos, pode causar diarreia, pseudopolipose, microulcerações, sangramento e fibrose (TURNER *et al.*, 2011). Por causa de compressão de vasos pelos granulomas, na esquistossomose hepatointestinal, ocorre hipertensão portal pré-sinusoidal (GRYSEELS 2012; HAMS *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2014). A hipertensão intra-hepática por fibrose é de caráter irreversível, levando à hepatoesplenomegalia, além de angiogênese (MARTINELLI, 2004; ANDRADE & SANTANA, 2010). Circulação colateral e varizes esofagianas são propensas a rompimento, podendo causar hemorragias (MARTINELLI, 2004; GRYSEELS 2012; COLLEY *et al.*, 2014). Por essas vias, ovos também podem chegar a outros órgãos e causar comprometimento destes, como quadros pulmonares (SCHWARTZ, 2002; GRYSEELS, 2012;; COLLEY *et al.*, 2014).

Quadros clínicos envolvendo o sistema nervoso central, agrupados como neuroesquistossomose, também se apresentam como uma complicação da esquistossomose

(FERRARI, 2004; ROSS *et al.*, 2012). Essa forma é independente de carga parasitária e fase da infecção, e a presença de ovos no sistema nervoso central está associada à migração errática de adultos e oviposição *in situ*, ou embolia de ovos pelo plexo de Batson (FERRARI, 2004). Seus sintomas são variáveis, dependendo da região afetada, e incluem dor de cabeça, convulsão, hemiparesia, nistagmo, distúrbios de fala e ataxia (FERRARI, 2004; CAROD-ARTAL, 2008; ROSS *et al.*, 2012).

Apesar de suas consequências para a patologia da esquistossomose, a reação granulomatosa ao redor dos ovos apresenta papel protetor (HAMS *et al.*, 2013). A resposta imune de perfil Th-2, de ponto de vista evolutivo, é, primariamente, uma reação a danos teciduais (ALLEN & WYNN, 2011). Algumas glicoproteínas com atividade enzimática excretadas e secretas pelo ovo, como ω -1, possuem efeitos hepatotóxicos, e o granuloma participa na contenção desses componentes, prevenindo dano hepático (DUNNE *et al.*, 1991; HAMS *et al.*, 2013). Em camundongos deficientes de IL-4, IL-13 e IL-4R α , incapazes de promover esse tipo de resposta, ocorrem extensas lesões hemorrágicas intestinais, promovendo caquexia, seguida de morte dos animais por hepatotoxicidade aguda, consequência do aumento de TNF- α , IFN- γ , óxido nítrico, e formação de granulomas não fibróticos (BRUNET *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 2000; HERBERT *et al.*, 2004; HAMS *et al.*, 2013; SCHWARTS *et al.*, 2014).

Por fim, a partir da 11^a/12^a semana, os granulomas periovulares são modulados devido ao aumento da resposta imune reguladora, caracterizando a fase crônica da esquistossomose (DUNNE & COOKE, 2005; TURNER *et al.*, 2011; HAMS *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2014). Durante essa fase, ocorre o predomínio de citocinas como IL-10 e TGF- β (HESSE *et al.*, 2004; DUNNE & COOKE, 2005; TAYLOR *et al.*, 2006; ZACCONE *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2011).

Quando não controladas, as resposta Th-1 e Th-2, iniciadas durante as duas primeiras fases da infecção, são a principal causa da patologia provocada por *S. mansoni*, podendo levar à morte (HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004). O excesso de polarização Th-1 leva à formação de granulomas não fibróticos e hepatotoxicidade exacerbada, enquanto a falta do controle de Th-2 acarreta fibrose exacerbada, alta celularidade em granulomas e uma doença de caráter emaciante na fase crônica (HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004). O controle dessas respostas é mediado por IL-10, tanto de fonte de células da imunidade inata quanto adaptativa, apresentando um papel imprescindível no controle da morbidade da esquistossomose durante a fase crônica (HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2006).

A resposta regulatória se desenvolve em paralelo às respostas de perfil Th-1 e Th-2 na esquistossomose (TURNER *et al.*, 2011). Da mesma forma que há participação de células Treg naturais, a apresentação antígenos do ovo por células dendríticas induz a expressão de Foxp3⁺ em células T num processo dependente de TGF-β, além de diferenciação de células B regulatórias, ambas produtoras de IL-10 (TAYLOR *et al.*, 2006; LAYLAND *et al.*, 2007; ZACCONE *et al.*, 2009; HAEBERLEIN *et al.*, 2017). Com a cronificação da infecção, células Treg passam por expansão e se acumulam tanto em linfonodos quanto nos próprios granulomas em formação, levando à diminuição do seu tamanho e menor celularidade (TURNER *et al.*, 2011; HAMS *et al.*, 2013; SCHWARTS & FALLON, 2018). Esse perfil de resposta, que perdura pelo resto da infecção, além de ser responsável pela evolução menos grave da esquistossomose, pode afetar outros processos inflamatórios e infecciosos, inclusive a infecção por *Leishmania* sp. (HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2006).

2.2 Leishmaniose tegumentar americana

As leishmanioses humanas são causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, os quais podem afetar desde tegumento até órgãos internos (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; PEARSON & SOUSA, 1996; REITHINGER *et al.*, 2007; CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014). Várias espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes tanto ao subgênero *Leishmania* quanto ao subgênero *Viannia*, são agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana, destacando-se as espécies *L. amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, que apresentam maior relevância epidemiológica no Brasil (REITHINGER *et al.*, 2007; OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012; BRASIL, 2017; SCORZA *et al.*, 2017).

Segundo o mais recente relatório da Organização Mundial da Saúde sobre leishmanioses (WHO, 2018b), a doença se encontra amplamente distribuída no mundo (figura 4), sendo endêmica em cinco continentes, afetando países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e desenvolvidos. Estima-se que, mundialmente, ocorram entre 0,7 e 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar por ano (ALVAR *et al.*, 2012; PIGOTT *et al.*, 2014). Os casos registrados nas Américas correspondem a 24% do total, sendo que mais da metade destes ocorrem somente no Brasil, Colômbia e Peru. No Brasil, foram reportados 12690 novos casos de leishmaniose tegumentar no ano de 2016, sendo ele um dos seis países no mundo a relatar incidência maior do que 10000 para leishmaniose tegumentar nesse ano, e

estima-se que 70% de sua população esteja em risco de ser infectada (WHO, 2016b; WHO, 2018b).

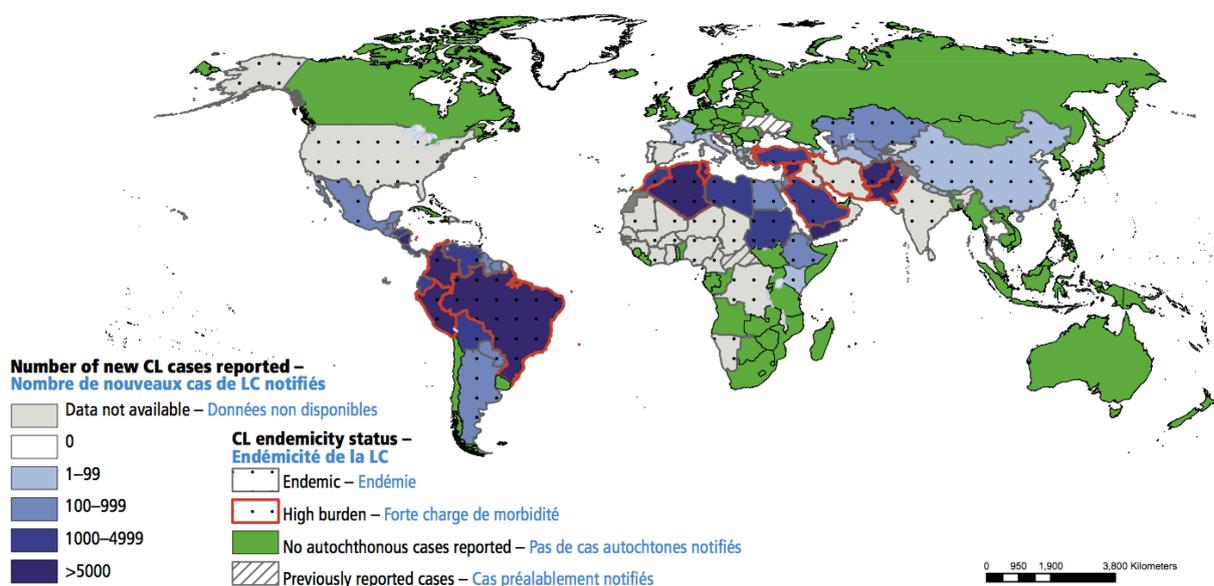


Figura 4: Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar em 2016. O Brasil é um dos únicos países com mais de 5000 casos reportados de leishmaniose tegumentar (■). Fonte: WHO, 2018b.

O controle e manejo das leishmanioses são baseados, principalmente, em quimioterapia (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). O sucesso da terapia anti-leishmania também depende de vários fatores, como o estado imune do hospedeiro, o fármaco (preparação e administração) e a susceptibilidade da cepa do parasito (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015). No entanto, os fármacos utilizados, como antimoniais pentavalentes e anfotericina B, são tóxicos e exigem longos períodos de tratamento, havendo seleção de cepas resistentes devido à desistência e consequente falha de esquemas terapêuticos (CROFT *et al.*, 2006; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Alguns casos de falha terapêutica também têm sido relacionados à ocorrência de coinfeções helmínticas (O'NEAL *et al.*, 2007).

2.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo heteroxênico (figura 5), infectando hospedeiros vertebrados e invertebrados. Apesar de alguns pontos serem bem estabelecidos, alguns outros têm sido modificados conforme a biologia do parasito é estudada mais a fundo.

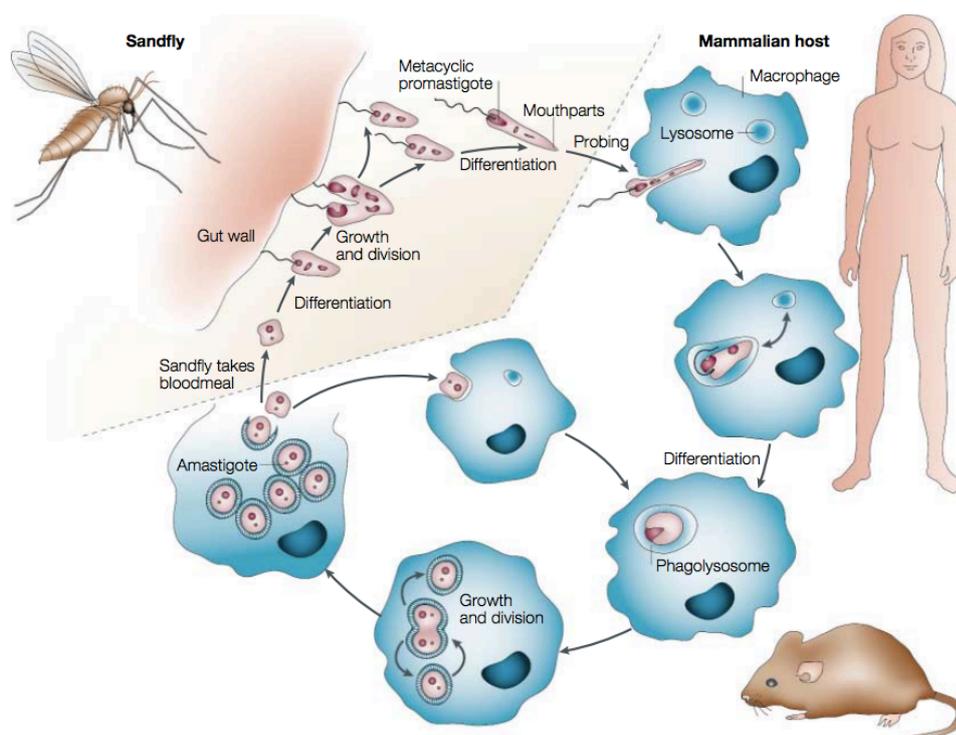


Figura 5: Ciclo de *Leishmania* sp. Fonte: SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002.

Flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, são vetores permissivos ao crescimento de parasitos desse gênero (revisado em MAROLI *et al.*, 2013). Potencialmente, na Oceania, membros da família Ceratopogonidae também podem servir de vetores para *Leishmania* sp. (SEBLOVA *et al.*, 2015). A infecção dos vetores ocorre a partir da ingestão de formas amastigotas presentes dentro de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (LAWYER *et al.*, 1990; BATES, 2007).

Uma vez no intestino dos flebotomíneos, as amastigotas se tornam formas promastigotas procíclicas, que secretam de quitinases e escapam da matriz peritrófica, aderindo ao epitélio indestinal, diferenciando-se em formas replicativas morfológicamente distintas (ROGERS *et al.*, 2008; ROGERS, 2012; BATES, 2018; SERAFIM *et al.*, 2018). A partir daí, algumas formas migram para a porção anterior do intestino, em direção à válvula estomodeal, onde são geradas as formas infectantes para mamíferos, as promastigotas metacíclicas (ROGERS, 2012; BATES 2018; SERAFIM *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que o processo de metaciclogênese, antes tido como final, já que promastigotas metacíclicas não se multiplicam, pode ser revertido. Serafim *et al.* (2018) demonstraram que o repasto sanguíneo pode amplificar a infecção no vetor, aumentando o número de formas

replicativas retroleptomônadas, as quais darão origem a mais promastigotas metacíclicas.

Durante o repasto sanguíneo por uma fêmea infectada, formas do parasito, incluindo promastigotas metacíclicas, estágio infectante, são regurgitadas na derme do hospedeiro vertebrado (BATES *et al.*, 2007; ROGERS, 2012; SERAFIM *et al.*, 2018). No local da infecção, as promastigotas começam a interagir e infectar células do hospedeiro. As diferentes espécies de *Leishmania* são, na fase crônica da infecção, parasitos de células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, monócitos e células dendríticas (SIBLEY, 2011; FEIJÓ *et al.*, 2016; ROMANO *et al.*, 2017). No entanto, outras células participam diretamente interação parasito-hospedeiro.

Para *L. major*, foi mostrado que as primeiras células a chegarem no local de infecção, os neutrófilos, servem de hospedeiras temporárias para promastigotas (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008; RITTER *et al.*, 2009). Essa espécie é capaz de manter os neutrófilos viáveis até a chegada de células do sistema fagocítico mononuclear (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008). Ao entrarem em apoptose, os neutrófilos infectados servem de entrada silenciosa, cunhada de cavalo-de-Troia, de *L. major* em células hospedeiras propriamente ditas, infectando, preferencialmente, monócitos inflamatórios (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008; ROMANO *et al.*, 2017).

O que foi mostrado para *L. major*, no entanto, não é necessariamente verdade para outras espécies de *Leishmania*. Neutrófilos apresentam efeito protetivo na infecção por *L. amazonensis*, cujas promastigotas são mortas por essas células (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; CARLSEN *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2014). Já promastigotas de *L. braziliensis* não são capazes de manter neutrófilos viáveis até a infiltração de macrófagos e acabam morrendo no interior de neutrófilos (FALCÃO *et al.*, 2014). Isso evidencia um outro papel desse tipo celular na infecção por essas espécies. Além disso, *L. amazonensis* se mostra capaz de infectar fibroblastos por mecanismos independentes de fagocitose (DEDET *et al.*, 1983; CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2019), indicando que possa existir mais de um possível cavalo-de-Troia entre espécies de *Leishmania*. Essas diferenças só reforçam a dificuldade de extrapolar resultados obtidos utilizando uma espécie de *Leishmania* para outras.

Romano *et al.* (2017) mostraram que, uma vez dentro de neutrófilos, *L. major*, majoritariamente, infecta células do sistema fagocítico mononuclear recém infiltradas, e não macrófagos residentes. Na interação direta entre promastigotas e macrófagos, o reconhecimento do parasito ocorre por CD11b, TLR2 e TLR4, favorecendo a fagocitose e ativação dessas células (DE VEER *et al.*, 2003; KROPF *et al.*, 2004; GUERRA *et al.*, 2010;

FARIA *et al.*, 2012). O envolvimento de outros TLR, como 3 e 5, ainda permanecem não muito bem estudados (GHOSH & STUMHOFER, 2013; GURUNG & KANNEGANTI, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2016).

Mesmo que a forma de entrada mais importante de *Leishmania* em células do sistema fagocítico mononuclear seja a fagocitose, o parasito também apresenta um papel ativo para que isso aconteça. Movimentação e polarização das promastigotas metacíclicas são essenciais para o processo de infecção em macrófagos, assim como estimulação do recrutamento de lisossomos da célula hospedeira para síntese do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em amastigotas (FORESTIER *et al.*, 2011). Uma vez dentro de sua célula hospedeira, o sucesso do parasitismo é profundamente dependente do estado de ativação desta (INIESTA *et al.*, 2002; SIBLEY, 2011; LIU & UZONNA, 2012; FEIJÓ *et al.*, 2016).

A amplificação da infecção no hospedeiro vertebrado, especialmente *in vivo*, ainda não é completamente clara. Observações *in vitro* apontam para a liberação de amastigotas por mecanismos exocíticos da célula hospedeira, e não por simples rompimento dessas células (SCHAIBLE *et al.*, 1999; RITTIG & BOGDAN, 2000). Uma vez parasitando com sucesso a pele do hospedeiro, as amastigotas podem infectar um novo vetor durante o repasto sanguíneo (LAWYER *et al.*, 1990; BATES, 2007; BATES 2018; SERAFIM *et al.*, 2018).

2.2.2 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana

As apresentações clínicas da LTA são determinadas, entre outros fatores, por um balanço entre as respostas pró-inflamatória e anti-inflamatórias do hospedeiro (OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012; SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017). Populações humanas são naturalmente heterogêneas quanto à resposta a antígenos de *Leishmania* sp., o que pode levar um indivíduo a ser mais ou menos propenso a certa manifestação clínica (POMPEU *et al.*, 2001; CASTELLUCCI *et al.*, 2006; LEOPOLDO *et al.*, 2006; CASTELLUCCI *et al.*, 2010; CASTELLUCCI *et al.*, 2011; CASTELLUCCI *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2016). Além de infecções subclínicas, suas formas variam desde leishmaniose cutânea localizada, até formas mais graves, com comprometimento de mucosas e formas anérgicas (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017).

A forma clínica mais prevalente da LTA é a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que pode ser causada por *L. braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, entre outras (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017). Suas lesões,

normalmente únicas, se desenvolvem entre 2 e 8 semanas após a infecção, progredindo de lesões nodulares para úlceras características com bordas elevadas (PEARSON & SOUSA, 1996). Linfadenopatia pode ocorrer antes ou concomitantemente às lesões cutâneas (BARRAL *et al.*, 1995a; SOUSA *et al.*, 1995; BOMFIM *et al.*, 2007). Normalmente, a resolução da LCL acontece até mesmo sem tratamento, tendo a doença caráter autolimitado (SCORZA *et al.*, 2017). No entanto, as lesões, tratadas ou não, resultam em cicatrizes deprimidas e hipopigmentadas, além da cura não ser esterilizante, ainda podendo ser encontrados parasitos após remissão clínica (SCHUBACH *et al.*, 1998a; SCHUBACH *et al.*, 1998b).

A LCL é, dentre as manifestações da LTA, a que apresenta um equilíbrio maior entre respostas imune pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias, com reação de hipersensibilidade tardia (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017). Entre outros fatores, o desequilíbrio dessas respostas tem consequências clínicas diferentes, dependendo de se a resposta é mais polarizada para um perfil pró-inflamatório, anti-inflamatório ou regulatório, conforme a figura 6 (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017).

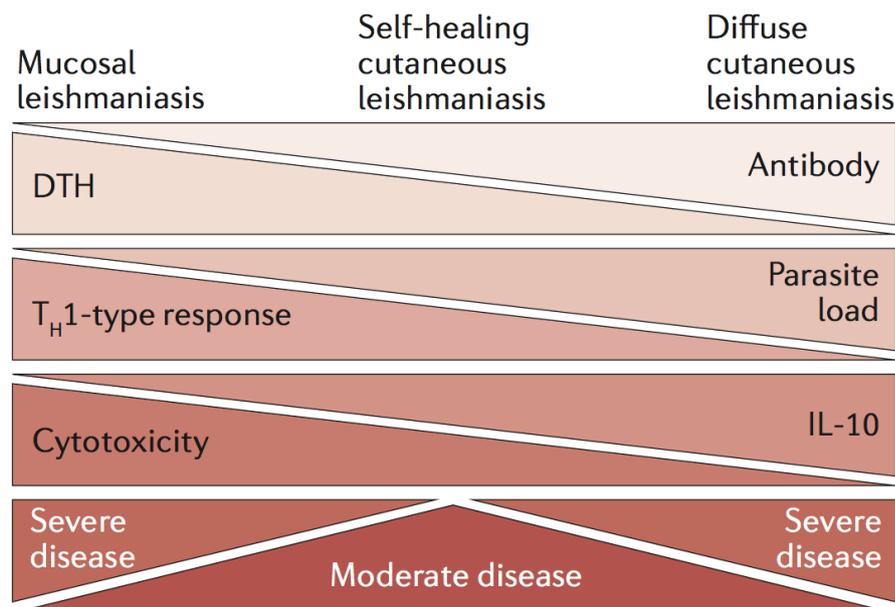


Figura 6: Espectro de doenças na leishmaniose tegumentar. Fonte: SCOTT & NOVAIS, 2016.

A leishmaniose mucosa (LM) tem como principal agente etiológico *L. braziliensis*, mas já foram registrados casos devido à infecção por *L. (V.) panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (SANTRICH *et al.*, 1990; BARRAL *et al.*, 1991; OSORIO *et*

al., 1998). Essa manifestação é, muitas vezes, uma complicação de LCL, sendo mais prevalente em indivíduos malnutridos e com maior número de lesões cutâneas (JONES *et al.*, 1987; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MACHADO-COELHO *et al.*, 2005; SCORZA *et al.*, 2017). Ela é caracterizada pelo comprometimento de áreas como mucosa nasal, palato mole, faringe, laringe, lábios e bochechas, podendo acometer também traqueia e genitália (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; PEARSON & SOUSA, 1996; SCORZA *et al.*, 2017).

A LM tem sido associada a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tanto de perfil Th-1, como IFN- γ e TNF- α , quanto Th-17, como IL-17, quando comparada com LCL, resultando em uma reação de hipersensibilidade muito mais intensa (BACELLAR *et al.*, 2002; BACELLAR *et al.*, 2009; BOAVENTURA *et al.*, 2010). Também tem sido relatada aumentada atividade citolítica de linfócitos T CD8⁺ e células NK em comparação a indivíduos com LCL (BRODSKYN *et al.*, 1997), além de baixa indução de mecanismos imunomodulatórios, com baixos níveis de IL-10, bem como as células isoladas destes pacientes são menos responsivas a essa citocina devido à menor expressão de seu receptor (BRODSKYN *et al.*, 1997; BACELLAR *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005; GAZE *et al.*, 2006). Como consequência da resposta pró-inflamatória exacerbada, lesões na mucosa apresentam carga parasitária mais baixa que em lesões cutâneas (SCHRIEFER *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2017).

Essa forma clínica é de difícil tratamento, com maior frequência de falhas terapêuticas e recidivas, sendo necessário, muitas vezes, mais de um ciclo de tratamento (LESSA *et al.*, 2001; AMATO *et al.*, 2007). Como alternativa, tem sido utilizada pentoxifilina, um anti-inflamatório inibidor de TNF- α , associado ao tratamento com antimonial pentavalente, o que tem levado à re-epitelização total das lesões em 90 dias e sem recidivas após um ano do tratamento (LESSA *et al.*, 2001).

Outra forma metastática da LTA é a leishmaniose disseminada (LD), cujos agentes etiológicos são *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. amazonensis* (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; COUPPIÉ *et al.*, 2004; HASHIGUCHI *et al.*, 2016; ESPINOZA-MORALES *et al.*, 2017). Essa manifestação clínica é caracterizada por lesões múltiplas e pleomórficas, variando entre acneiformes, papulares, nodulares e ulceradas, em duas ou mais regiões não contíguas do corpo (COSTA *et al.*, 1986; TURETZ *et al.*, 2002; HASHIGUCHI *et al.*, 2016). A metástase do parasito a partir do sítio de infecção ocorre de poucos dias a algumas semanas após o aparecimento da lesão inicial (CARVALHO *et al.*, 1994, TURETZ *et al.*, 2002). Células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LD produzem níveis mais baixos de IFN- γ e TNF- α em

comparação a de indivíduos com LCL, mas níveis similares de IL-5 e IL-10 (TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006). No entanto, isso pode ser reflexo da migração de células ativadas, causando sua depleção no sangue, já que nas lesões a resposta parece tão intensa quanto em lesões de LCL (MACHADO *et al.*, 2011). Os indivíduos costumam responder ao tratamento, mas vários ciclos ou tratamentos mais longos são recomendados (TURETZ *et al.*, 2002; HASHIGUCHI *et al.*, 2016).

Outra manifestação grave de LTA, a leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA), também chamada de leishmaniose difusa, é causada, nas américas, por *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. (V.) pifanoi* (CONVIT *et al.*, 1972; VELASCO *et al.*, 1989; BARRAL *et al.*, 1991). As lesões da LCDA são múltiplas, nodulares e não ulcerativas, apresentando grande número de amastigotas e baixo infiltrado linfocitário (CONVIT *et al.*, 1972; HASHIGUCHI *et al.*, 2016; SCORZA *et al.*, 2017). Apesar do estabelecimento de resposta humoral, a resposta celular contra *Leishmania* sp. é comprometida na LCDA (PETERSEN *et al.*, 1982; BARRAL *et al.*, 1995b). A alta carga parasitária e caráter não ulcerado das lesões, além de baixa resposta de hipersensibilidade tardia e proliferação de linfócitos em resposta a antígenos de *Leishmania* sp. apontam para a anergia dos indivíduos que desenvolvem essa forma (PETERSEN *et al.*, 1982; BARRAL *et al.*, 1995b; BOMFIM *et al.*, 1996; SCORZA *et al.*, 2017).

Em lesões de LCDA, é menor a frequência de células expressando óxido nítrico sintase induzida (iNOS), IL-12, IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL4, CCL17 e CCL19, indicando deficiência na montagem e na efetividade de resposta Th-1 para controle do parasito (RITTER *et al.*, 1996; DÍAZ *et al.*, 2006; CAMPANELLI *et al.*, 2010; DÍAZ *et al.*, 2013; CAÑEDA-GUZMAN *et al.*, 2014). Também ocorre redução no infiltrado de células CCR5⁺, incluindo linfócitos T CD4⁺ e células NK circulantes e intralesionais, as quais também produzem menos IFN- γ e TNF- α quando estimuladas (RITTER *et al.*, 1996; CAMPANELLI *et al.*, 2010; CAÑEDA-GUZMAN *et al.*, 2014).

Indivíduos apresentando essa manifestação clínica não respondem bem aos tratamentos convencionais para LTA, e recidivas são comuns (SALAIZA-SUAZO *et al.*, 1999; CALVOPINA *et al.*, 2006; ZERPA *et al.*, 2007). Alternativamente, associação do tratamento clássico com imunoterapia apresenta melhores resultados, com melhora clínica associada ao aumento de células NK e monócitos pró-inflamatórios (CONVIT *et al.*, 1989; BADARÓ & JOHNSON, 1993; PEREIRA *et al.*, 2009a).

2.2.3 Imunopatologia e imunidade celular em resposta a *Leishmania* sp.

No desenvolvimento das lesões de LTA, há um balanço entre resposta de perfil Th-1, com produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 para controle do parasito, mas que causa dano tecidual, e respostas Th-2 e regulatória, com produção de IL-4 e IL-10, permitindo manutenção da infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A cura clínica é relacionada à produção de IFN- γ e à própria ulceração, haja vista que o tratamento prévio ao desenvolvimento da lesão é menos eficiente (BOMFIM *et al.*, 1996; CASTELLANO *et al.*, 2009; UNGER *et al.*, 2009). De outro lado, níveis elevados de IL-10 intralesionais são associados à falha terapêutica (BOURREAU *et al.*, 2001).

Várias células exercem papéis na imunopatologia da LTA. Além de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T auxiliares, células NK e linfócitos T citotóxicos também são recrutados para o local da infecção e têm funções na resposta a *Leishmania* sp. e no processo de formação da lesão (SCORZA *et al.*, 2017). Nos momentos iniciais da infecção, células NK são as principais produtoras de IFN- γ , aumentando a produção de IL-12 por células dendríticas, promovendo maior diferenciação de células T virgens em células Th-1 (PRAJEETH *et al.*, 2011). No entanto, TGF- β é capaz de inibir a ativação dessas células (LAOUAR *et al.*, 2005; ANDERSSON *et al.*, 2008). Já linfócitos T citotóxicos, mais tardiamente, apesar de apresentarem efeitos protetores, também são diretamente associados à progressão das lesões e metástase (BELKAID *et al.*, 2002b; FARIA *et al.*, 2009; NOVAIS *et al.*, 2013).

2.2.3.1 Resposta de macrófagos à infecção por *Leishmania* sp.

Sendo parasitos principalmente de células do sistema fagocítico mononuclear, o sucesso de *Leishmania* sp. nos vacúolos parasitóforos em macrófagos depende do estado de ativação dessas células (SIBLEY, 2011; ALEXANDER & BROMBACHER, 2012; LIU & UZONNA, 2012; FEIJÓ *et al.*, 2016; ROMANO *et al.*, 2017). Os diferentes perfis de ativação de macrófago acontecem em resposta a diferentes estímulos e apresentam expressões diferenciadas de receptores, citocinas, quimiocinas e moléculas efetoras, resumidos na figura 7 (MANTOVANI *et al.*, 2004; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014; MARTINEZ & GORDON, 2014).

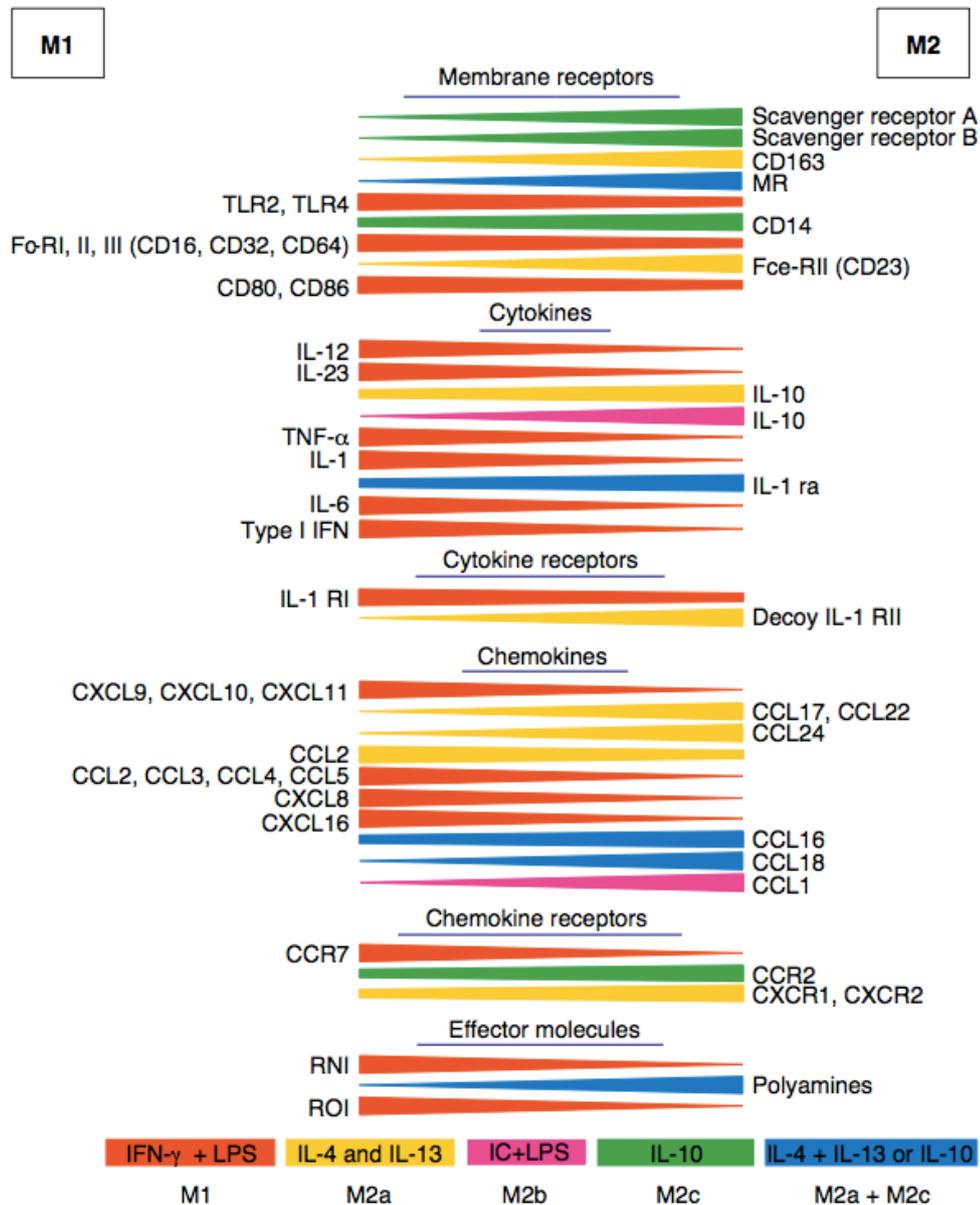


Figura 7: Diferentes perfis de ativação de macrófagos, seus respectivos estímulos e expressão de receptores, citocinas, quimiocinas e moléculas efetoras. Fonte: MANTOVANI *et al.*, 2004.

Em um ambiente pró-inflamatório, com predominância de linfócitos Th-1, na presença de citocinas como IFN- γ , TNF- α e MIF, ou em resposta a estímulos como LPS, ocorre a diferenciação de macrófagos em M1, os macrófagos ditos classicamente ativados (JÜTTNER *et al.*, 1998; WAKIL *et al.*, 1998; ALEXANDER & BROMBACHER, 2012; LIU & UZONNA, 2012; MANTOVANI *et al.*, 2004). Em resposta a esses estímulos, tais macrófagos expressam níveis elevados de citocinas como IL-1, IL-12 e TNF- α e quimiocinas como CCL4 e CCL5, além de moléculas efetoras no combate contra patógenos intracelulares, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ALEXANDER & BROMBACHER,

2012; LIU & UZONNA, 2012; MANTOVANI *et al.*, 2004; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014; MARTINEZ & GORDON, 2014).

É bem estabelecido que esse padrão de resposta é o responsável pelo controle da infecção por *Leishmania* sp. (ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). No reconhecimento do parasito por TLR2 e TLR4, também bem expressos em M1, levam à expressão de iNOS, que converte arginina em óxido nítrico, tóxico para o parasito (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1991; MANTOVANI *et al.*, 2004; MUKBEL *et al.*, 2007). Além da própria toxicidade do óxido nítrico, o consumo de L-arginina pela iNOS limita a disponibilidade desse nutriente para as amastigotas (MUXEL *et al.*, 2018a), e inibe a atividade de arginase (INIESTA *et al.*, 2001). Também foi evidenciado que a produção de IL-1 β induzida pela ativação de inflamassomo via NLRP3 é de grande importância para produção de óxido nítrico frente à infecção por *L. amazonensis* (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013).

Já o perfil de macrófagos alternativamente ativados, que favorece o crescimento de *Leishmania* sp. (OLIVEIRA *et al.*, 2014), é mais heterogêneo. Foi proposto por Mantovani e colaboradores (2004) que fossem utilizadas as nomenclaturas M2a, M2b e M2c, em vez de simplesmente M2, para representar perfis que diferem tanto de acordo com os estímulos que levam à sua diferenciação quanto o que é expresso por eles. A ativação de macrófagos por essas vias os leva a ter papéis em respostas de perfil Th-2 ou regulatórias, além de reparo de tecidos (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Os macrófagos M2a assim se tornam na presença de IL-4 e IL-13, citocinas de perfil Th-2 (MANTOVANI *et al.*, 2004). Apesar de apresentarem alguns papéis não totalmente esclarecidos na resposta contra algumas espécies de *Leishmania*, IL-4 e IL-13 são citocinas que favorecem o parasitismo de *L. amazonensis* e *L. mexicana* no hospedeiro vertebrado, de forma contrária a respostas predominantemente Th-1 (INIESTA *et al.*, 2002; ALEXANDER & BROMBACHER, 2012).

A partir da sinalização por IL-4R α , ocorre inibição da expressão de IL-12R β 2, IL-12p40, IFN- γ e óxido nítrico, limitando o estabelecimento de uma resposta de perfil Th-1 para controle de *L. amazonensis* e *L. mexicana* (ALEXANDER *et al.*, 2002; PADIGEL *et al.*, 2003). Outro fator que favorece o crescimento do parasito é a expressão de arginase, que, além de competir com iNOS por substrato, gera ureia e ornitina a partir de arginina, alimentando a via de produção de poliaminas, nutrientes necessários às amastigotas (INIESTA *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2004; RATH *et al.*, 2014; MUXEL *et al.*, 2018a). A inibição da atividade de arginase utilizando metabólitos secundários de iNOS leva à diminuição no crescimento de *Leishmania* (INIESTA *et al.*, 2001).

Macrófagos M2b são diferenciados a partir de estimulação por imunocomplexos e LPS (MANTOVANI *et al.*, 2004). Essa população se difere de M2a por sua alta produção de TNF- α e óxido nítrico e baixa de arginase, enquanto se diferencia de M1 por baixa expressão de IL-12, alta produção de IL-10 e por induzirem diferenciação de células Th-2 e resposta humoral (EDWARDS *et al.*, 2006). A interação com neutrófilos apoptóticos também promove a diferenciação para M2b, favorecendo o crescimento de *L. major* (FILARDY *et al.*, 2010).

A estimulação por IL-10, em um ambiente regulatório, levando à diferenciação para M2c, também promove persistência da infecção por *Leishmania* pela inibição da resposta de perfil Th-1 (BELKAID *et al.*, 2001; NOBEN-TRAUTH, 2003). No entanto, a cura esterilizante observada em animais deficientes de IL-10 ocasiona perda da imunidade a reinfeções (BELKAID *et al.*, 2002a). Apesar de M2c e M2b serem células produtoras de IL-10, a produção de IL-10 por células T é a principal fonte dessa citocina para susceptibilidade à infecção por *L. major* (SCHWARZ *et al.*, 2013). A expressão também de TGF- β por macrófagos que apresentam esse perfil de ativação é associada ao favorecimento de uma resposta regulatória (ANDERSSON *et al.*, 2008; ZACCONE *et al.*, 2009).

2.3 Influência da infecção por *S. mansoni* em comorbidades

Devido à cronicidade da esquistossomose e sua capacidade de induzir diferentes padrões de resposta imune, infecções por *S. mansoni* já se mostraram capazes de modular doenças causadas por respostas de perfil Th-1, como diabetes e esclerose múltipla, bem como Th-2 exacerbada, como doenças alérgicas (COOKE *et al.*, 1999; LA FLAMME *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2016; RESENDE *et al.*, 2019). Existem evidências de que a esquistossomose também afete a imunidade da prole de grávidas infectadas ainda durante a vida intrauterina (ELIAS *et al.*, 2006; ELIAS *et al.*, 2007; ELIOTT *et al.*, 2007; STRAUBINGER *et al.*, 2014; LANG & SCHICK, 2017; LACORCIA & DA COSTA, 2018).

A polarização da resposta Th-2 e indução da resposta regulatória por parasitos do gênero *Schistosoma* também são capazes de modificar o curso de outras infecções parasitárias. Humanos naturalmente coinfectados com *S. mansoni* e *Ascaris lumbricoides* eliminam menos ovos de *A. lumbricoides*, enquanto coinfeção de *S. mansoni* e ancilostomatídeos leva à maior eliminação de ovos deste (FLEMING *et al.*, 2006). Em coinfeções experimentais de *S. mansoni* e *Strongyloides venezuelensis*, ocorre diminuição da carga parasitária de *S. venezuelensis* (DE REZENDE *et al.*, 2015).

Quanto a protozoários, um modelo de coinfeção de *Schistosoma* sp. bem

estudado envolve parasitos do gênero *Plasmodium* (SOKHNA *et al.*, 2004; LYKE *et al.*, 2005; COLLEY *et al.*, 2014). Estudos realizados com crianças coinfectadas com *S. mansoni* ou *S. haematobium* e *Plasmodium* sp. mostram efeitos protetivos do helminto na morbidade da malária, sendo que indivíduos coinfectados nos quais a infecção por *S. mansoni* era leve (< 100 ovos/g de fezes) apresentaram menor probabilidade de ter acessos maláricos, maior tempo até a apresentação de sintomas, menor taxa de anemia e esplenomegalia (SOKHNA *et al.*, 2004; LYKE *et al.*, 2005; HÜRLIMANN *et al.*, 2019). No entanto, crianças com alta carga parasitária de *S. mansoni* apresentaram acessos maláricos mais frequentes (SOKHNA *et al.*, 2004). Assim como para outros protozoários, os dados sugerem que balanço entre respostas pró-inflamatória e anti-inflamatórias são determinantes para a patologia provocada na infecção por *Plasmodium* sp. (revisado em SCHOFIELD & GRAU, 2005).

2.3.1 Coinfecção por *S. mansoni* e *Leishmania* sp.

Dentre os fatores relacionados a comorbidades, coinfeções helmínticas estão entre os fatores mais importantes para as leishmanioses (AKUFFO *et al.*, 2018). No Brasil, as áreas endêmicas para esquistossomose e LTA se sobrepõem (figura 8). Além disso, estudos realizados na Bahia, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais já comprovaram a existência de populações com indivíduos coinfectados, chegando a uma prevalência de 16,7% de coinfecção entre pacientes com LTA (O'NEAL *et al.*, 2007; NEWLOVE *et al.*, 2011; AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2016; MIRANDA, 2018).

Apesar disso, poucos estudos têm avaliado o efeito da coinfecção por *S. mansoni* na LTA. Em população humana, estudo realizado por O'Neal *et al.* (2007) mostrou que a resposta ao tratamento de lesões de LTA foi menos eficiente em indivíduos que apresentavam coinfecção com *L. braziliensis* e helmintos, incluindo *S. mansoni*. Nos indivíduos co-infectados, foi observado maior tempo para cura, sendo que em 30,2% dos casos as lesões persistiram por mais de 90 dias após o início do tratamento. Azeredo-Coutinho *et al.* (2016) mostraram que infecções por helmintos são relacionadas à maior prevalência de manifestações mucosas de LTA e pior resposta ao tratamento com antimonial em comparação a indivíduos infectados somente por *L. braziliensis*. Um ensaio clínico realizado por Newlove *et al.* (2011) evidenciou, contudo, que o tratamento da helmintoses não impactava o tratamento da leishmaniose em pacientes coinfectados.

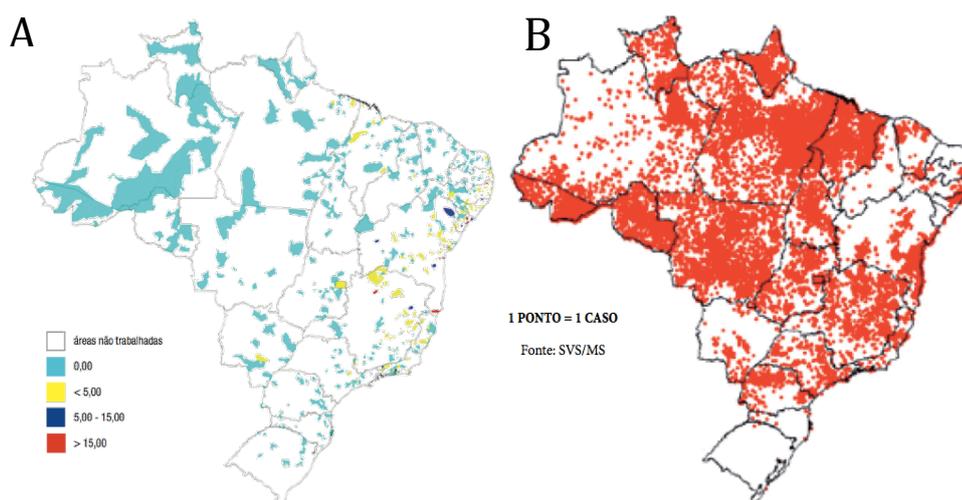


Figura 8: Distribuição geográfica da esquistossomose e da leishmaniose tegumentar no Brasil. A: distribuição da esquistossomose segundo o INPEG, 2010 – 2015. B: distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil em 2015. Fontes: BRASIL, 2017; KATZ, 2018.

Nesta mesma população humana, Bafica *et al.* (2011) mostraram que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com LTA, quando coestimuladas com antígenos de vermes adultos e de *Leishmania* produziam níveis maiores de IL-10 do que quando eram estimuladas somente com antígenos de *Leishmania*. Em trabalho seguinte (BAFICA *et al.*, 2012), foi demonstrado que a coestimulação de monócitos tanto com antígenos de *Leishmania* quanto com antígenos de *S. mansoni* afetou negativamente a capacidade dessas células de apresentarem antígenos pela diminuição da expressão de HLA-DR, CD80 e CD86, além de aumentar a frequência de células T $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ e CTLA-4^+ e diminuir a frequência de CD28.

Em Lopes *et al.* (2014), células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico de indivíduos com LTA, com estimulação com antígenos de *L. braziliensis* e *S. mansoni*, têm sua maturação direcionada para um perfil regulatório, com expressão aumentada de IL-10, IL-10R, CD80, CD83, CD86 e HLA-DR. Lopes *et al.* (2018) mostraram que células dendríticas de indivíduos com esquistossomose em cocultura com linfócitos autólogos são mais susceptíveis à infecção *in vitro* por *L. braziliensis* quando comparadas às células de indivíduos não infectados por *S. mansoni*. Quando analisada a ativação tanto das células dendríticas quanto dos linfócitos, foi possível notar que, de forma similar a Lopes *et al.* (2014), estas células apresentaram um perfil de ativação mais regulatório. Células dendríticas apresentaram aumento da expressão de IL-10 e seu receptor, e diminuição na de IL-12p40, enquanto linfócitos expressaram mais CTLA-

4 e menos CD28 (LOPES *et al.*, 2018).

Por fim, Lopes *et al.* (2019), ao estimularem células dendríticas de indivíduos com LTA com Sm29, antígeno de verme adulto de *S. mansoni*, e infectá-las *in vitro* com *L. braziliensis* na presença de linfócitos autólogos, obtiveram maior expressão de CD80, CD83, CD86, IL-10 e IL-10R em células dendríticas, assim como menor expressão de CD1a e IL-12. Por sua vez, linfócitos tiveram expressão elevada de CD28, CTLA-4, CD25 e níveis diminuídos de IFN- γ , evidenciando o papel específico de antígenos de *S. mansoni* na modulação desses dois tipos celulares (LOPES *et al.*, 2019)

Os dados observados em população demonstram a importância da coinfeção *S. mansoni* e *Leishmania* sp. na resposta imune e tratamento da LTA e no controle da doença, mas não permitiram investigar detalhadamente quais os mecanismos envolvidos (KLEIN, 2000; CARVALHO *et al.*, 2015). Experimentos *in vivo* com animais experimentais são de grande auxílio para o entendimento de processos que ocorrem na coinfeção entre *Schistosoma* sp. e *Leishmania* sp. em um ambiente mais controlado. No entanto, os trabalhos realizados até agora apresentaram resultados controversos por não haver padronização de cepa e inóculo dos parasitos, momento da coinfeção e fundo genético dos camundongos utilizados (JI *et al.*, 2003; MACHMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009b; COSTA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Trabalho realizado por Yole *et al.* (2007), com infecção concomitante por *S. mansoni* e *L. major*, mostrou que as lesões cutâneas observadas em camundongos BALB/c coinfectados eram maiores que nos mono-infectados com *L. major*. Além disso, os animais coinfectados tinham proliferação menos intensa de linfócitos *in vitro* em resposta a antígenos de *Leishmania* quando comparados com animais infectados apenas com *L. major* (YOLE *et al.*, 2007). Khayeka-Wandabwa *et al.* (2013), também com infecção simultânea, não relataram diferenças no desenvolvimento de lesões, mas mostraram que o tratamento concomitante das duas parasitoses é mais eficiente para resolução das lesões cutâneas do que somente o tratamento da leishmaniose.

La Flamme *et al.* (2002) realizaram a infecção de camundongos BALB/c com *L. major* duas semanas após a infecção por *S. mansoni*, para que o pico da resposta Th-1 contra *L. major* coincidissem com o pico da resposta Th-2 contra *S. mansoni*. Seus resultados evidenciaram uma progressão mais lenta das lesões cutâneas em animais coinfectados, assim como retardo no processo de cura e mudança no perfil de citocinas expressas (LA FLAMME *et al.*, 2002). Fora isso, La Flamme *et al.* (2002) também recuperaram

macrófagos peritoneais inflamatórios de animais na oitava semana de infecção por *S. mansoni* para analisar sua susceptibilidade à infecção *in vitro* por *L. major*. Ao fazerem isso, foi mostrado que, num momento inicial, a porcentagem de células infectadas era semelhante em ambos os grupos, mas os macrófagos dos animais com *S. mansoni* eram refratários à ativação por IFN- γ , produzindo menos NO que o grupo controle, não controlando a infecção por *L. major* (LA FLAMME *et al.*, 2002).

Coelho *et al.* (1980), o primeiro relato de coinfeção experimental por *Schistosoma* sp. e *Leishmania* sp., infectou camundongos com *L. mexicana* 60 dias após infecção com *S. mansoni* e observou que lesões causadas por *L. mexicana* apareciam mais cedo em animais coinfectados. Em contraste, Yoshida *et al.* (1999), ao coinfectar com promastigotas de *L. major* camundongos, tanto BALB/c quanto C57BL/6, durante a oitava semana de infecção de *S. mansoni*, não observaram diferença na evolução e na intensidade de lesões cutâneas entre os animais infectados somente com *L. major* e os coinfectados.

Entre trabalhos com humanos e modelos experimentais, até o momento, nenhum avaliou, com os mesmos critérios de carga e cepa dos parasitos, diferentes períodos da infecção por *S. mansoni*. Da mesma forma, pelo uso de espécies diferentes de *Leishmania*, deve-se considerar que coinfeções com *L. major* e *L. mexicana* podem não refletir fielmente o que aconteceria na coinfeção experimental com *L. amazonensis* por causa da diferença entre a resposta imune frente a esses parasitos (SACKS & NOBEN-THRAUT, 2002; JI *et al.*, 2003; MCMAHON-PRATTS & ALEXANDER, 2003; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Assim sendo, este trabalho visou a avaliar o efeito de diferentes fases da infecção por *S. mansoni* na maturação/diferenciação de macrófagos e como essa exposição pode afetar a resposta e a susceptibilidade celular à infecção por *Leishmania*. Além disso, para maior relevância epidemiológica, foi utilizada a espécie *L. amazonensis*, agente etiológico de LCDA (BARRAL *et al.*, 1991; SCORZA *et al.*, 2017), preenchendo essa lacuna na literatura.

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose e a leishmaniose tegumentar são parasitoses de grande importância na saúde pública do Brasil (CASAVECHIA *et al.*, 2018; MARTINS-MELO *et al.*, 2018), sendo Minas Gerais o segundo estado brasileiro mais afetado por doenças tropicais negligenciadas, atrás apenas de Goiás (MARTINS-MELO *et al.*, 2018). Juntas, a esquistossomose e a leishmaniose são responsáveis por mais de 45% dos valores de DALY por esse grupo de patologias no Estado (MARTINS-MELO *et al.*, 2018). O quadro se torna mais preocupante quando se considera a sobreposição das áreas de ocorrência destas parasitoses e os relatos de coinfeção em população humana (O'NEAL *et al.*, 2007; BRASIL, 2017; MARTINS-MELO *et al.*, 2018; MIRANDA, 2018).

Relativamente poucos estudos têm investigado os efeitos da coinfeção de *S. mansoni* e espécies dermatrópicas de *Leishmania*. Os que o fizeram até o momento utilizaram somente *L. braziliensis*, *L. mexicana* ou *L. major* e indicam que hospedeiros coinfectados apresentam retardo na cura de lesões, alterações no parasitismo e na ativação da resposta imune do hospedeiro, mas os mecanismos pelos quais isso acontece ainda são pouco conhecidos (COELHO *et al.*, 1980; YOSHIDA *et al.*, 1999; LA FLAMME *et al.*, 2002; O'NEAL *et al.*, 2007; YOLE *et al.*, 2007; BAFICA *et al.*, 2011; BAFICA *et al.*, 2012; KHAYEKA-WANDABWA *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019).

Os trabalhos realizados com humanos apresentam a desvantagem de não controlar com precisão em que época ocorreu a infecção dos indivíduos, e a literatura utilizando modelos experimentais não demonstra padronização quanto espécie, cepa e carga utilizada tanto de *S. mansoni* quanto de *Leishmania* sp. para infecção. Conforme amplamente demonstrado na literatura (SACKS & NOBEN-THRAUT, 2002; JI *et al.*, 2003; MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; PETRITUS *et al.*, 2012; SCOTT & NOVAIS, 2016), a resposta a *Leishmania* sp. é muito variável dependendo da espécie e cepa do protozoário, dificultando previsões acuradas sobre as consequências da coinfeção de *S. mansoni* e *L. amazonensis*, responsável por LCDA, uma das formas graves de LTA no Brasil (BARRAL *et al.*, 1991).

Poucos trabalhos investigam a participação de macrófagos nesse processo, e o que o fez utilizou macrófagos residentes (LA FLAMME *et al.*, 2002). Contudo, mais recentemente foi mostrado que *L. major* tem preferência por infectar, num primeiro momento, monócitos/macrófagos inflamatórios que recém infiltraram para o sítio de infecção, e não

células residentes (ROMANO *et al.*, 2017). Portanto, o uso de modelos *in vitro* que simulem mais devidamente essa população de células pode oferecer resultados mais acurados.

O entendimento da resposta específica a *L. amazonensis* se mostra importante levando em consideração que as helmintoses figuram entre os mais importantes fatores de modulação da resposta imune em leishmanioses (AKUFFO *et al.*, 2018), estando a anergia a essa espécie de *Leishmania* sp. relacionada com manifestações graves da doença (RITTER *et al.*, 1996; CAMPANELLI *et al.*, 2010; CAÑEDA-GUZMAN *et al.*, 2014). Portanto, é imprescindível esclarecer as alterações que ocorrem em macrófagos pela infecção por *S. mansoni* para elucidar mecanismos que acontecem na coinfeção *Schistosoma/Leishmania*. O melhor entendimento desse fenômeno pode gerar sugestões para um manejo mais adequado de pacientes coinfectados e auxílio aos programas de controle dessas parasitoses.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar como as diferentes fases da infecção por *S. mansoni* afeta a ativação de macrófagos derivados da medula óssea e sua susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade de macrófagos derivados de medula óssea recuperados de camundongos em diferentes fases da esquistossomose à infecção por *L. amazonensis*.
- Analisar diferenças na ativação de macrófagos derivados de medula óssea recuperados de camundongos em diferentes fases da esquistossomose frente à infecção por *L. amazonensis*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Para os experimentos, foram utilizadas fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o período experimental, os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia, em *racks* ventiladas com água e ração adequada fornecida *ad libitum*. Todos os procedimentos aqui descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número 398/2018, estando de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2 Parasitos

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a LE, originalmente isolada de paciente humano de Belo Horizonte. Sua manutenção tem sido realizada no Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (LABEIH) e feita por passagens consecutivas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e em hamster sírio, *Mesocricetus auratus* (CEUA/UFMG, nº 368/2018). Para obtenção de cercárias utilizadas nos experimentos, *B. glabrata* infectadas foram expostas à luz artificial por 4h e a solução contendo as larvas infectantes do helminto foi concentrada e lavada várias vezes com solução fisiológica. As cercárias recuperadas foram contadas e inoculadas por via subcutânea (50 por animal) no dorso dos camundongos, conforme descrito por Pellegrino e Macedo (1955).

Para infecção por *L. amazonensis*, foi utilizada a cepa PH8 (IFLA/BR/1967/PH8), mantida criopreservada no Laboratório de Biologia de *Leishmania* (ICB/UFMG). Seu cultivo foi realizado em meio α -MEM (Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) a 24 °C. Para a infecção de macrófagos, foram utilizadas promastigotas de cultura em fase estacionária, reisoladas de hamster sírio, até a 5^a passagem em meio de cultura.

5.3 Delineamento experimental

Para determinar como diferentes fases da infecção por *S. mansoni* podem afetar a

diferenciação e ativação de macrófagos e sua susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*, células da medula óssea foram recuperadas de animais de quatro grupos experimentais (6 camundongos/grupo): Grupo Controle - camundongos BALB/c não infectados por *S. mansoni*; Grupo Crônico - camundongos BALB/c com 12 semanas de infecção por *S. mansoni*; Grupo Agudo Pós-Postural - camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*; e Grupo Pré-Postural - camundongos BALB/c com 3 semanas de infecção por *S. mansoni*.

Para que a eutanásia dos animais ocorresse no mesmo dia e os animais tivessem a mesma idade no momento da obtenção das células, os 24 animais foram aleatoriamente separados nos 4 grupos experimentais e a infecção com *S. mansoni* dos animais do grupo crônico ocorreu no primeiro dia do protocolo experimental (12 semanas antes da eutanásia). Após 4 semanas, o grupo agudo pós-postural foi infectado da mesma forma e com a mesma dose de cercárias (8 semanas antes da eutanásia). Com 9 semanas do início do protocolo experimental, foi realizada a infecção dos animais do grupo pré-postural (3 semanas antes da eutanásia). O último grupo se manteve não infectado, conforme ilustrado na figura 9A.

Todos os animais foram eutanasiados após 12 semanas do início do protocolo experimental por injeção intraperitoneal de sobredose anestésica de quetamina (240 mg/kg, Dopalen, Jacareí, SP, Brasil) e xilazina (30 mg/kg, Kensol, Avellaneda, Argentina) e utilizados para recuperação de monócitos de medula óssea, os quais foram diferenciados em macrófagos e utilizados para infecção *in vitro* com *L. amazonensis*. Parâmetros das infecções *in vitro* foram analisados com 24, 48 e 72 h (figura 9B), como descrito em mais detalhes posteriormente.

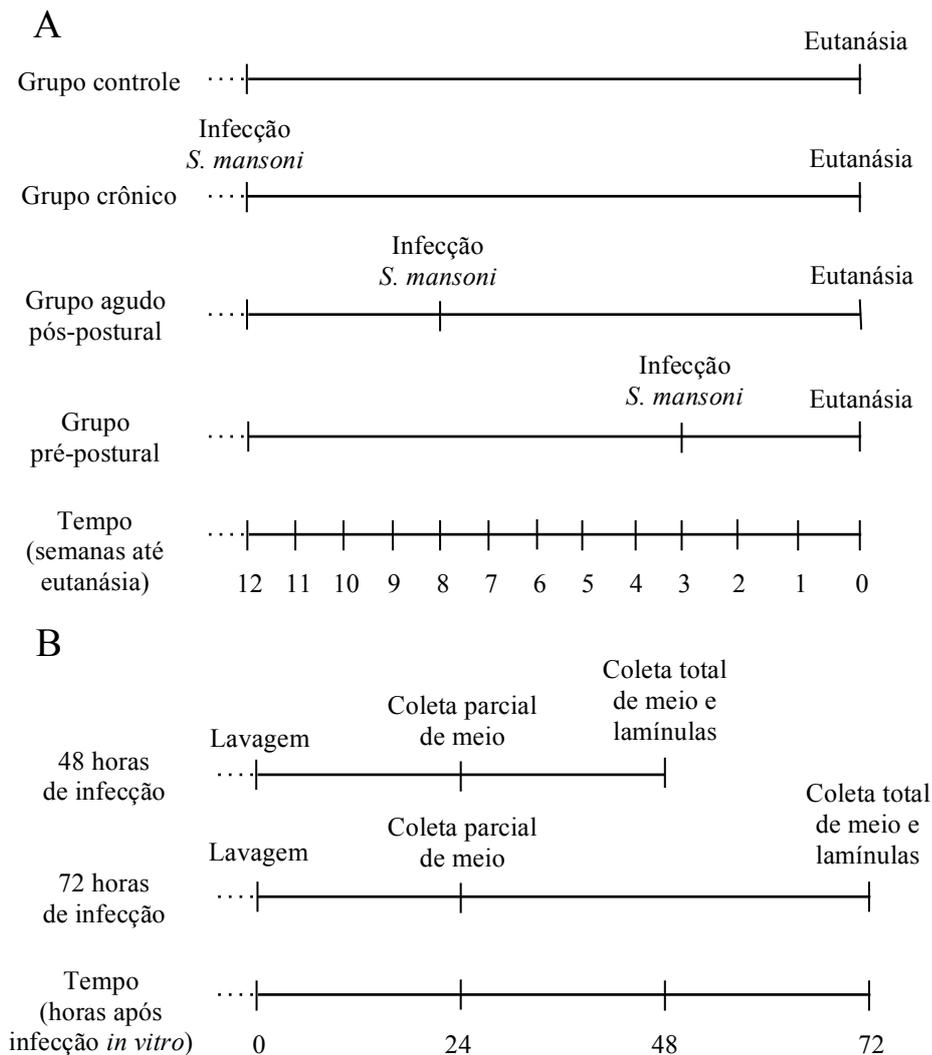


Figura 9: Planejamento da infecção por *S. mansoni* (A) de grupos utilizados para recuperação de macrófagos e infecção *in vitro* com *L. amazonensis* e tempos de coleta de material para análise (B). Fonte: elaborada pelo autor.

5.4 Recuperação de monócitos e diferenciação *in vitro*

A recuperação de precursores da medula óssea para diferenciação de macrófagos foi realizada de acordo com procedimento descrito por Joshi *et al.* (2008), com algumas alterações. Após eutanásia, foram retirados fêmur e tíbia dos camundongos nas diferentes fases da infecção por *S. mansoni*. O interior de cada osso foi lavado com meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 20% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia). Foi feito um *pool* das células da medula recuperada dos animais de um mesmo grupo experimental e o conteúdo foi centrifugado a 460 g, por 10 minutos a 4°C, e ressuspendidos em meio R20/30, composto de RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) com 20% de soro bovino

fetal (LGC Biotecnologia), 30% de meio condicionado de células L929, 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,0035% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). O sobrenadante de células L929 foi obtido pelo cultivo dessa linhagem celular em placas de cultura (Corning, NY, EUA) por sete dias, em 50 ml de meio RPMI completo, contendo RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia), 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,0035% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi retirado, filtrado com filtros de seringa esterilizantes (Corning). O sobrenadante de cultura de células L929 serviu como fonte de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que estimula a diferenciação de monócitos em macrófagos (JOSHI *et al.*, 2008; LUTZ *et al.*, 2017).

As células obtidas da medula óssea foram contadas em câmara de Neubauer com adição de azul de tripan (Gibco) para determinar o número de células obtido e sua viabilidade. Após contagem, foram plaqueadas em placa de Petri (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil), 7×10^5 células/ml num volume final de 10 ml, e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ em 10 ml de meio R20/30. O meio foi renovado ao quarto dia para retirada de células não aderentes. As células aderentes foram consideradas monócitos em processo de diferenciação. No sétimo dia, as células aderentes foram descoladas da placa com tripsina 0,5% (Gibco), contadas e plaqueadas em placas de 24 poços (Costar, Corning, NY, EUA) com lamínulas de plástico redondas de 13 mm (Sarstedt, Porto Feliz, SP, Brasil), 10^5 células por poço, e cultivadas em 500 µl de meio R20/30 por mais 48 horas. Ao fim desse período, os monócitos já diferenciados em macrófagos foram utilizados para infecção com *L. amazonensis*. Esse procedimento foi repetido para cada grupo experimental, totalizando 12 réplicas por grupo.

5.5 Infecção de macrófagos *in vitro*

Para o preparo dos parasitos para infecção, promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultura foram centrifugadas a 2460 g, por 10 minutos a 4 °C, e ressuspendidas em RPMI completo. A infecção dos macrófagos foi feita de acordo com Rocha *et al.* (2013), com algumas alterações. Resumidamente, foi retirado o meio de cultura de cada poço contendo macrófagos derivados de células da medula óssea e foi adicionado 300 µL de meio RPMI completo contendo 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária (*multiplicity of infection* – MOI 10:1). As culturas foram mantidas em estufa a 34 °C e 5% de CO₂ até o fim do experimento. Após 12 horas de exposição, as células foram

lavadas com 500 µl de PBS a 36 °C (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ • 7 H₂O 4,3 mM, pH 7,4) para remover parasitos não internalizados e 500 µl de meio RPMI completo foram adicionados. Células não infectadas com *L. amazonensis* foram mantidas nas mesmas condições. A infecção foi realizada em seis réplicas de cada grupo experimental, totalizando seis réplicas não infectadas e seis réplicas infectadas com *L. amazonensis*.

As culturas foram mantidas por mais 48 ou 72 horas após a infecção por *L. amazonensis*. Depois de 24 horas, foi realizada coleta de 150 µl do sobrenadante de cada poço para quantificação de mediadores imunológicos, os quais foram substituídos por RPMI completo. Após o término do protocolo experimental, os sobrenadantes da cultura foram totalmente retirados para dosagem de marcadores de ativação de macrófagos. As lamínulas redondas foram retiradas das placas, coradas com panótico rápido (RenyLab, Barbacena, MG, Brasil) e montadas com Entellan (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA) em lâminas de microscopia.

5.6 Avaliação de parasitismo e perfil de resposta de macrófagos

Para avaliação da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni*, nos tempos de 48 e 72 horas após infecção com *L. amazonensis*, foi realizada contagem, em microscópio óptico sob objetiva de imersão, de 100 a 200 macrófagos em cada lamínula. Com isso, foi determinada a porcentagem de macrófagos infectados, assim como o número total de amastigotas por macrófago e índice de infectividade (porcentagem de macrófagos infectados multiplicada pelo número de amastigotas por macrófago).

A análise do perfil de resposta de macrófagos frente à infecção por *L. amazonensis* foi realizada utilizando o sobrenadante das culturas para dosagem de mediadores imunológicos característicos de macrófagos, como descrito em mais detalhes a seguir, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após infecção.

5.6.1 Dosagem de citocinas e quimiocinas

No sobrenadante das culturas, foram dosadas as citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β e quimiocinas CXCL2, CCL5, CCL17 e CCL24. A dosagem foi feita por ELISA de acordo com as indicações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Para isso, foram sensibilizadas placas *half area* (Costar) com anticorpo de captura anti-citocina em questão na concentração indicada pelo fabricante. Após aproximadamente 12 horas, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) três vezes. Os poços foram bloqueados com solução de PBS contendo 1% de BSA por 1 hora, e mais três lavagens foram feitas após esse período. As amostras de cada réplica do experimento foram colocadas individualmente em poços, ao mesmo passo em que foi montada, em duplicata, soluções com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes analisadas para construção de uma curva padrão. A sensibilidade de cada curva, de acordo com o fabricante, é de 2000 pg/ml a 15,6 pg/ml para TNF- α , IL-10, TGF- β e CCL5, e de 1000 pg/ml a 7,8 pg/ml para CXCL2 e CCL24. Após 24 horas, as placas foram lavadas e, a cada poço, foi adicionado anticorpo de detecção anti-citocina de interesse conjugada à biotina e deixadas por 2 horas à temperatura ambiente. Passado esse tempo, as placas foram novamente lavadas e foi adicionada estreptavidina conjugada à peroxidase na concentração indicada pelo fabricante a cada poço por 30 minutos. Após a última lavagem, foi adicionado substrato (soluções estabilizadas de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1 v/v, R&D Systems) para revelar as placas, e a reação foi parada depois 30 minutos com H₂SO₄ 2 N. A absorbância das amostras e da curva padrão foi medida em leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices, San José, CA, EUA) a 450 nm, e as concentrações das citocinas nas amostras, em pg/ml, foi determinada por interpolação no gráfico resultante da curva padrão utilizando o SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices). Os limites inferiores de detecção foram determinados pela média dos valores dos brancos acrescida de dois desvios padrões.

5.6.2 Ensaio de atividade de arginase

A atividade de arginase foi estimada no sobrenadante das culturas pela produção teste colorimétrico a partir da produção de ureia pela degradação enzimática de L-arginina (HESSE *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2017). 50 μ l do sobrenadantes de cultura em microplaca de 96 poços (Sarstedt) foram ativados pela adição de 50 μ l de 10 mM MnCl₂ e 50 μ l de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 e incubação por 10 minutos a 55 °C. Em seguida, foram adicionados 25 μ l de L-arginina 0,5 M (Sigma-Aldrich) a 25 μ l das amostras ativadas, incubando a 37 °C por 30 minutos. A reação foi parada com 200 μ l de mistura ácida, contendo H₂SO₄ 96%, H₃PO₄ 85% e H₂O (1:3:7, v/v/v). Em seguida, foram adicionados 13 μ l de α -isonitrosopropiophenone a 9% (Sigma-Aldrich) em etanol 100% (Sigma-Aldrich), passando por aquecimento a 95 °C por 1 hora, seguido de incubação à temperatura ambiente

por 10 minutos. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices) a 540 nm. As concentrações das amostras foram obtidas pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de ureia (1000 mM – 1 mM) no *software* SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices). O limite inferior de detecção foi determinado pela média dos valores dos brancos acrescida de dois desvios padrões.

5.6.3 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada imediatamente após coleta dos sobrenadantes por meio da reação de Griess (TSIKAS, 2007). Foram adicionados 25 µl de cada amostra em microplaca de 96 poços (Sarstedt), ao mesmo passo em que foram adicionadas soluções de concentrações conhecidas de NaNO₂ (1000 µM – 1 µM), em duplicata, para construção de curva padrão. Às amostras e à curva, foram adicionados 25 µl de solução de ácido fosfórico 2,5% contendo 0,5% de sulfonilamida e 0,05% de N- α -naftil-etilenodiamina. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lidas em leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices) a 540 nm. A concentração das amostras foi obtida pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de nitrito no *software* SoftMax (Molecular Devices). O limite inferior de detecção foi determinado pela média dos valores dos brancos acrescida de dois desvios padrões.

5.7 Análise estatística

Para análise estatística dos dados obtidos e montagem de gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7. Todos os dados passaram por teste para determinação de sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram apresentados em gráficos em média \pm erro padrão da média. Análise de variância (Two-way ANOVA) foi utilizada para comparar três ou mais grupos. Os pós-testes de Sidak e de Tukey foram utilizados para comparações múltiplas, respectivamente, entre o mesmo grupo em tempos diferentes e entre os grupos em um mesmo tempo. Para comparações dos grupos infectados em relação ao controle, foi utilizado teste t. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Susceptibilidade de macrófagos de animais com *S. mansoni* à infecção por *L. amazonensis*

Primeiramente, foram avaliadas as alterações que as diferentes fases de infecção por *S. mansoni* provocam no parasitismo de *L. amazonensis* em macrófagos (figuras 10 e 11). Os parâmetros considerados foram porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas por macrófago e índice de infectividade.

Quando analisada a porcentagem de macrófagos infectados (figura 10), não houve diferença significativa entre grupos em um mesmo tempo. O único grupo cuja taxa de infecção de macrófagos aumentou discretamente foi o grupo de macrófagos recuperados de camundongos com infecção pré-postural ($p = 0,0154$), no qual houve um aumento de 29.41% entre 48 e 72 horas.

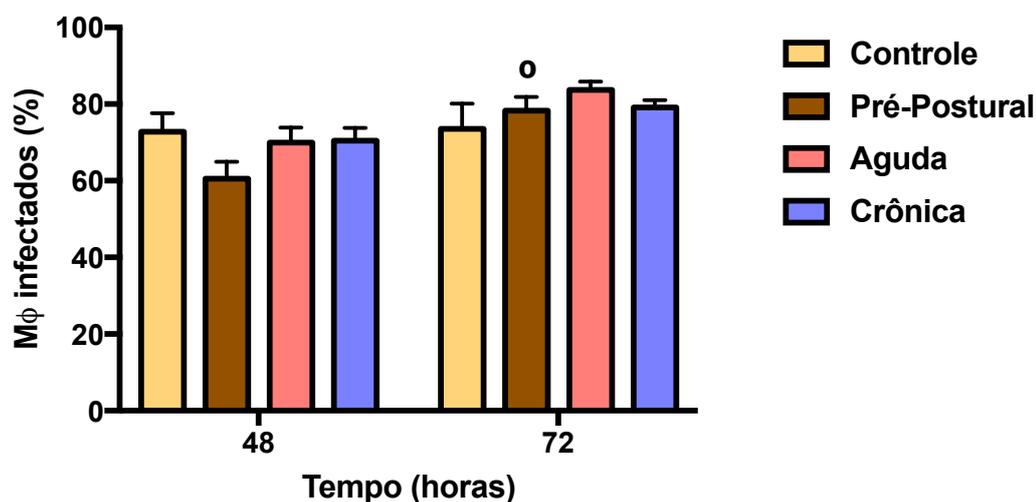


Figura 10: Porcentagem de macrófagos de medula óssea recuperados em diferentes fases da infecção por *S. mansoni* infectados *in vitro* por *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. ^o representa diferença significativa entre o mesmo grupo em tempos diferentes. ^o $p < 0,05$. M ϕ : macrófagos.

Por outro lado, a diferença mais marcante entre os grupos se evidenciou no número de parasitos no interior das células. A ilustração dos macrófagos infectados nos diferentes grupos experimentais (figura 11A-D) indica que, apesar da porcentagem

semelhante de macrófagos infectados, o número de amastigotas em cada macrófago recuperado de animais em fase aguda da esquistossomose (figura 11A) foi notadamente maior que nos grupos controle, de infecção pré-postural e crônica (figuras 11B, C, D, respectivamente).

Para confirmar essa observação visual, foi realizada a contagem de amastigotas intracelulares (figura 11E). Inicialmente, foi verificado que o número de amastigota/macrófago aumentou significativamente entre 48 e 72 horas de infecção nos grupos de macrófagos derivados da medula de animais na fase pré-postural ($p = 0,0458$) e da fase aguda pós-postural da esquistossomose ($p = 0,0009$), sendo que, em macrófagos do grupo de esquistossomose aguda, foi verificado um acréscimo de 97% no número de amastigotas no período. Após 72 horas da infecção, macrófagos infectados desse mesmo grupo teve o maior número de amastigotas ($5,124 \pm 0,7534$ amastigotas/macrófago), sendo o único significativamente diferente de todos os outros grupos de estudo, com 63% mais amastigotas que no grupo controle não infectado por *S. mansoni* ($3,146 \pm 0,7553$ amastigotas/macrófago; $p = 0,0147$).

Esses resultados são refletidos no índice de infectividade das mesmas células (figura 11F). Nesse critério, os macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com esquistossomose aguda, novamente, são os únicos que apresentam índice de infectividade maior que todos os outros grupos 72 horas pós-infecção (controle: $251,7 \pm 81,05$; pré-postural: $257,4 \pm 41,95$; agudo: $435,5 \pm 76,91$; crônico: $220,3 \pm 15,56$). Ademais, entre os tempos de 48 e 72 horas, foi o único grupo que apresentou aumento significativo do índice de infectividade ($p = 0,0018$).

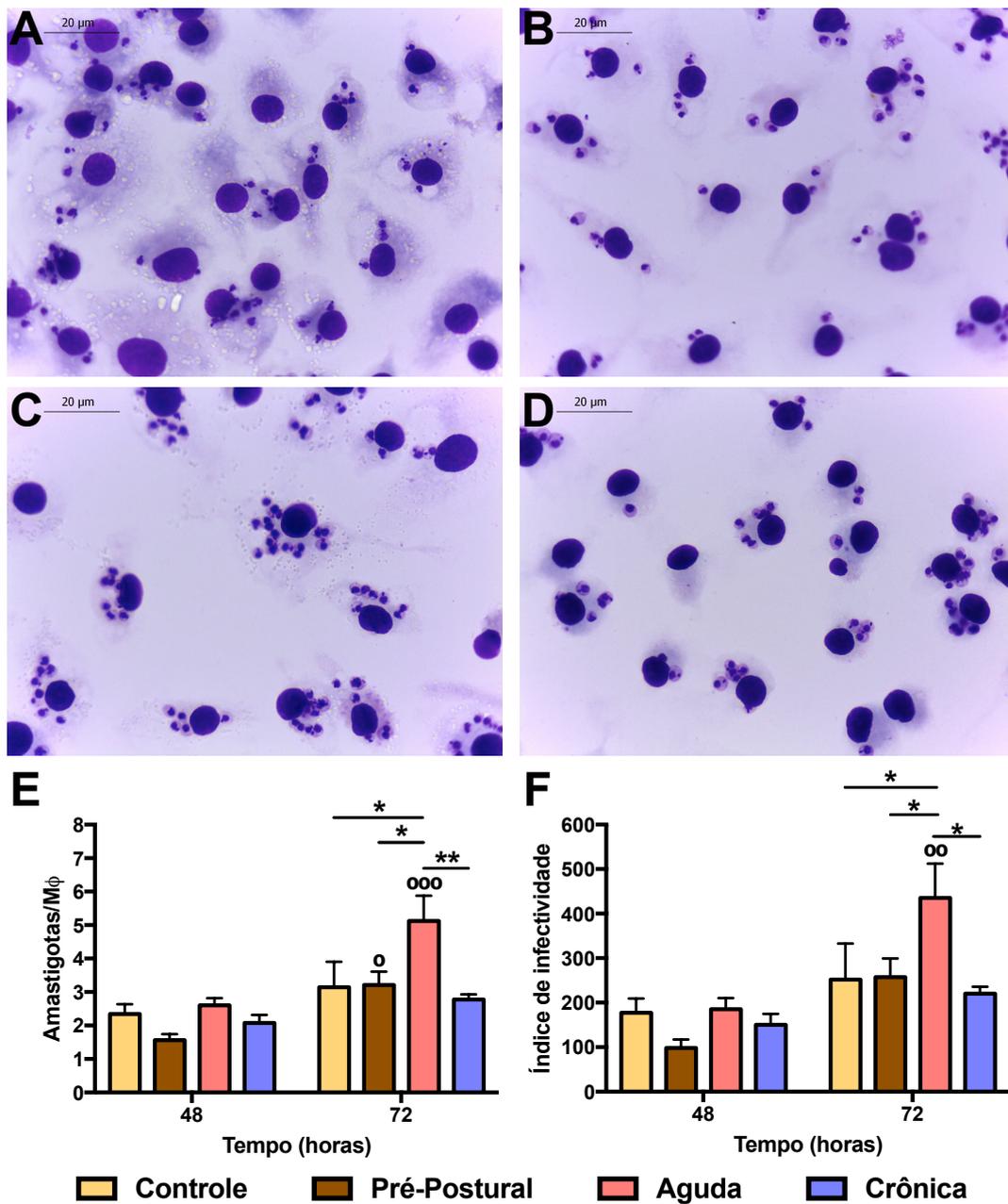


Figura 11: Susceptibilidade de macrófagos diferenciados de medula óssea à infecção por *L. amazonensis* durante diferentes fases da infecção por *S. mansoni*. A, B, C, D: fotomicrografias (aumento 1000x) de macrófagos infectados com *L. amazonensis* recuperados de animais não infectados por *S. mansoni* (A), e na fase pré-postural (B), aguda (C) e crônica (D) da esquistossomose. E: número de amastigotas por macrófago. F: índice de infectividade *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. ° representa diferença significativa entre o mesmo grupo em tempos diferentes. Mφ: macrófago. ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Mφ: macrófago.

6.2 Ativação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com diferentes períodos de esquistossomose frente à infecção por *L. amazonensis*

Foram dosadas as quimiocinas CXCL2, CCL5, CCL17 e CCL24 no sobrenadante das culturas de células recuperadas em diferentes fases de infecção por *S. mansoni*, infectadas ou não com *L. amazonensis in vitro*. Nas condições experimentais descritas, não foram verificados níveis detectáveis de CCL17 em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados).

Macrófagos derivados da medula de camundongos não infectados cultivados na ausência de promastigota de *L. amazonensis* também não apresentaram níveis detectáveis de CXCL2 após 24h de cultivo, independente do grupo experimental (figura 12A). Entretanto, essas células produziram CXCL2 após 48 e 72 horas. Nesse mesmo período de cultura, também foi possível quantificar a presença de CXCL2 no sobrenadante de cultivo de macrófagos derivados de animais na fase pré-postural da esquistossomose. Pequena concentração de CXCL2 também foi detectada no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados derivados de camundongos cronicamente infectados por *S. mansoni* e cultivados por 72 horas; no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

Quando macrófagos desses mesmos grupos foram infectados com *L. amazonensis* (figura 12B), foi observada uma mudança drástica no perfil de expressão de CXCL2. Somente no sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula de animais com esquistossomose crônica foi detectada a presença de CXCL2 em todo o período analisado. Após 72 horas de cultivo, foi verificado que a concentração de CXCL2 nos macrófagos derivados de camundongos com esquistossomose crônica e infectados com *L. amazonensis* foi 9,2 vezes maior ($79,21 \pm 23,93$ pg/ml) que em macrófagos do mesmo grupo experimental não infectados pelo protozoário ($8,567 \pm 4,256$ pg/ml). Neste mesmo período, macrófagos infectados de todos os grupos experimentais apresentaram níveis detectáveis de CXCL2, sendo a concentração desta quimiocina no sobrenadante de macrófagos derivados de animais com esquistossomose crônica estatisticamente maior que no sobrenadante de macrófagos do controle ($27,71 \pm 8,491$ pg/ml; $p = 0,0105$), da fase pré-postural ($14,57 \pm 9,018$; $p = 0,0008$) e da fase aguda pós-postural ($18,01 \pm 7,516$ pg/ml; $p = 0,0017$).

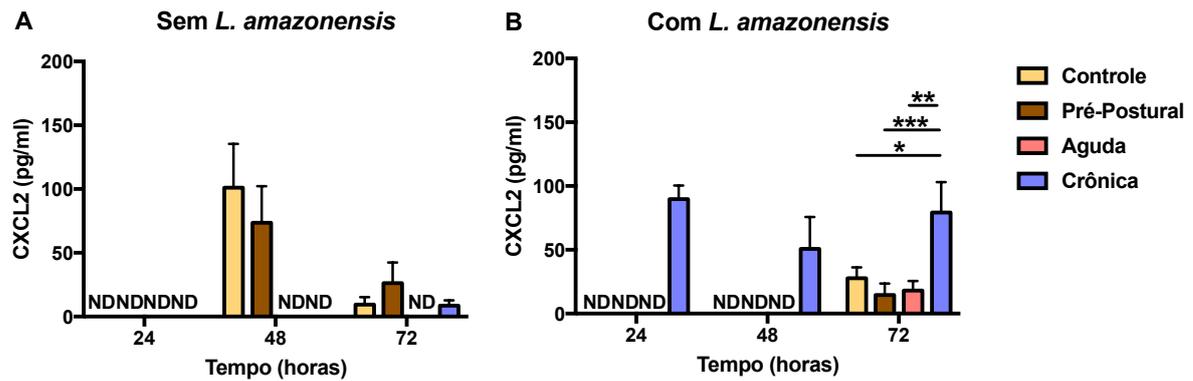


Figura 12: Produção de CXCL2 por macrófagos derivados de monócito de medula. A: concentrações de CXCL2 no sobrenadante de cultura macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: concentrações de CXCL2 no sobrenadante de cultura macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. ND: não detectável.

Com relação à produção CCL5 em macrófagos, uma das marcas de ativação de macrófagos M1, foi possível verificar que células diferenciadas a partir da medula de camundongos com esquistossomose na fase pré-postural apresentaram produção de CCL5 estatisticamente maior que os demais grupos mesmo na ausência de infecção por *L. amazonensis* (figura 13A). As concentrações mais elevadas de CCL5 foram detectadas após 72 horas de cultivo, sendo que o grupo crônico ($194,2 \pm 17,83$ pg/ml) teve concentração de CCL5 maior que no grupo controle ($90,39 \pm 3,617$ pg/ml; p = 0,0135), e os dois foram menores que no grupo pré-postural ($395,5 \pm 70,38$ pg/ml; p < 0,0001). Nesta condição, macrófagos derivados de animais com esquistossomose aguda pós-postural apresentaram, em todos os tempos, as menores concentrações de CCL5 no sobrenadante das culturas, com progressiva diminuição com o tempo até níveis não detectáveis com 72 horas.

A infecção por *L. amazonensis* (figura 13B) estimulou a produção de CCL5 em todos os grupos experimentais; entretanto, o perfil de estimulação maior no grupo pré-postural se manteve. Nessa condição experimental, não foi encontrada diferença significativa na concentração de CCL5 entre os grupos com 24 horas de cultivo. Também foi verificado que a produção de CCL5 por macrófagos infectados dos grupos controle, agudo e crônico aumentaram progressivamente de 24 a 72 horas de cultivo, mas sem diferença estatística entre eles. Entretanto, em macrófagos derivados de animais com esquistossomose na fase pré-postural e infectados pelo protozoário, a concentração de CCL5 aumentou significativamente

a partir de 48 horas de cultivo. Nesse período, a produção de CCL5 pelos macrófagos recuperados de animais em fase pré-postural e infectados com *L. amazonensis* ($527,5 \pm 22,58$ pg/ml) foi significativamente maior que em todos os outros grupos ($p < 0,0001$), chegando a uma média de 2.7 vezes maior que o controle ($193,6 \pm 15,86$ pg/ml). Padrão semelhante foi detectado após 72 h de cultivo, quando macrófagos controle produziram $323,3 \pm 26,58$ pg de CCL5/ml e macrófagos do grupo pré-postural produziram $467,6 \pm 64,08$ pg de CCL5/ml ($p = 0,0026$). Nesse mesmo tempo, os macrófagos de animais em fase crônica tiveram níveis menores de CCL5 que nos sem *S. mansoni* ($205,8 \pm 44,17$ pg/ml; $p = 0,0192$).

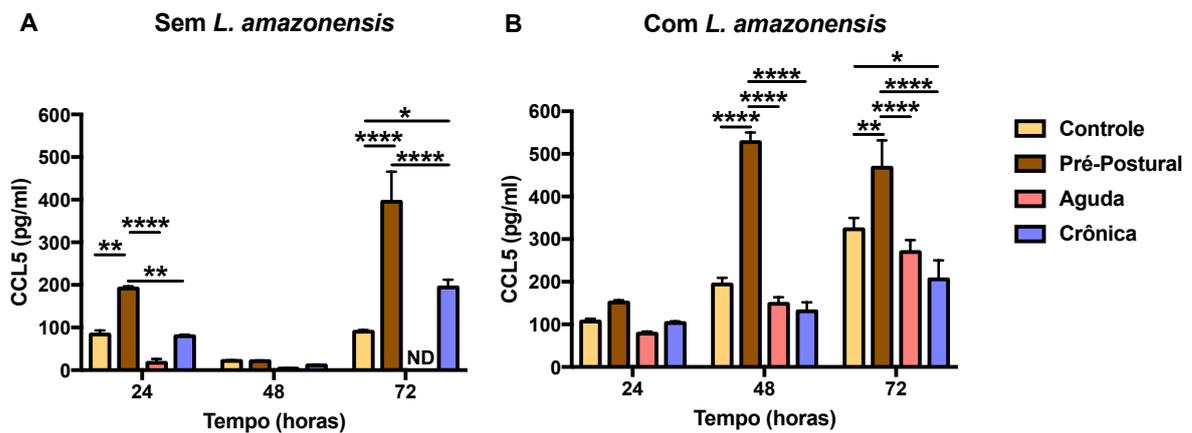


Figura 13: Produção de CCL5 por macrófagos derivados de monócito de medula. A: concentrações de CCL5 no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: concentrações de CCL5 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

CCL24 foi a única citocina que apresentou níveis detectáveis somente nos macrófagos não infectados por *L. amazonensis* (figura 14A). Com 24 horas de cultivo, macrófagos derivados de animais não infectados com *S. mansoni* ($32 \pm 3,363$ pg/ml) tiveram níveis estatisticamente maiores de CCL24 que nos grupos pré-postural ($17,24 \pm 3,422$ pg/ml; $p = 0,0264$) e crônico ($12,46 \pm 3,576$ pg/ml; $p = 0,003$). No tempo de 48 horas, os grupos agudo ($17,12 \pm 2,614$ pg/ml; $p < 0,0001$) e crônico ($47,52 \pm 5,843$ pg/ml; $p = 0,0003$) apresentaram concentrações menores que no grupo controle ($69,74 \pm 2,07$ pg/ml). Por fim, 72 horas após a troca de meio, o grupo controle ($65,12 \pm 2,888$ pg/ml) apresentou maiores

concentrações de CCL24 que no grupo de fase crônica ($46,93 \pm 8,613$ pg/ml; $p = 0,0064$). Os níveis de CCL24 foram indetectáveis em todos os grupos experimentais com infecção por *L. amazonensis* (figura 14B).

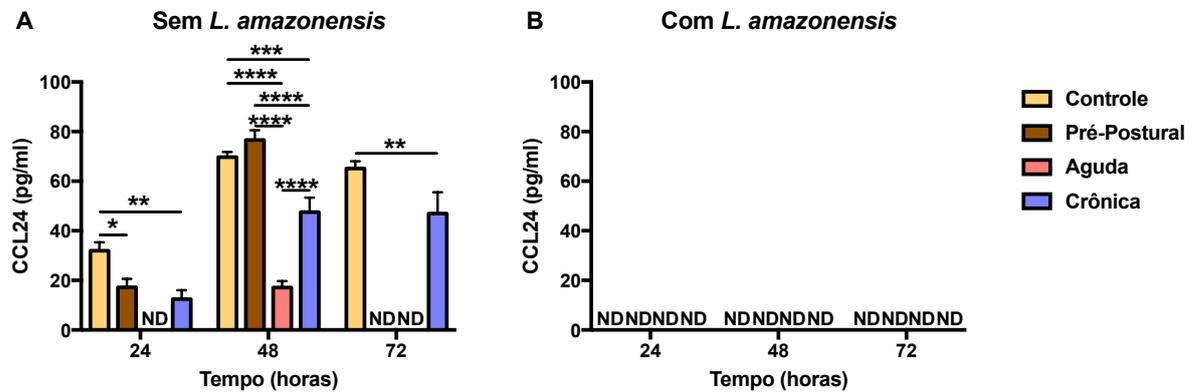


Figura 14: Produção de CCL24 por macrófagos derivados de monócito de medula. A: concentrações de CCL24 no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: concentrações de CCL24 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ND: não detectável.

Como outros indicadores de ativação de macrófago, foram dosadas as citocinas IL-10 e TGF- β , que são marcas regulatórias, e TNF- α , uma citocina pró-inflamatória. As concentrações de TNF- α foram indetectáveis em todos os grupos pelos métodos utilizados (dados não mostrados).

Entre as citocinas de perfil regulatório, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de IL-10 de nenhum dos grupos experimentais (figura 15). Apesar de terem sido observadas pequena queda nas concentrações dessa citocina entre o tempo de 48 horas e 72 horas, as diferenças não foram significativas.

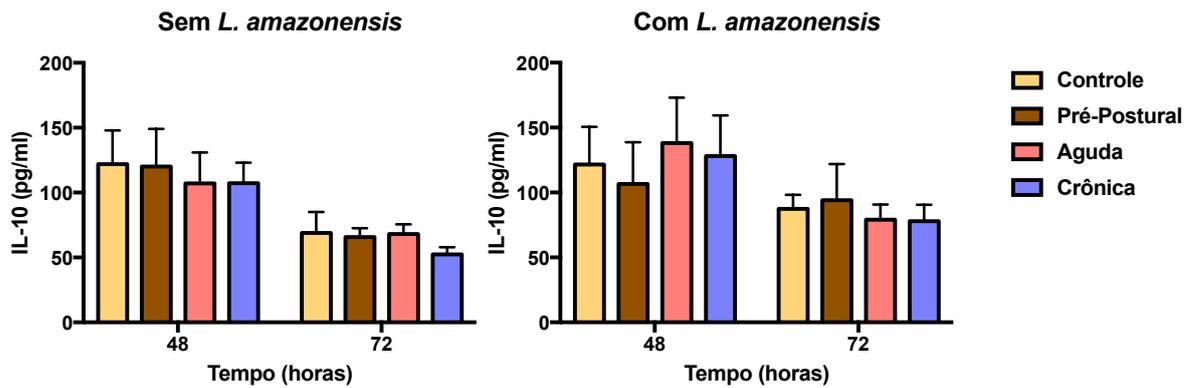


Figura 15: Produção de IL-10 por macrófagos derivados de monócito de medula. A: concentrações de IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: concentrações de IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão.

Para TGF- β (figura 16), diferenças significativas só foram encontradas em células infectadas com *L. amazonensis* (figura 16B). Independentemente da fase, os macrófagos obtidos de todos os grupos infectados por *S. mansoni* (pré-postural: 809,7 \pm 148,3 pg/ml; agudo: 591,6 \pm 67,72 pg/ml; crônico: 652,5 \pm 77,48 pg/ml) apresentaram maior produção dessa citocina no tempo de 72 horas em relação ao controle não infectado por *S. mansoni* (126,7 \pm 73,58 pg/ml). As células deste mesmo grupo também foram as únicas que tiveram diminuição nos níveis de TGF- β em seus sobrenadantes com a infecção *in vitro* em comparação com células sem *L. amazonensis*.

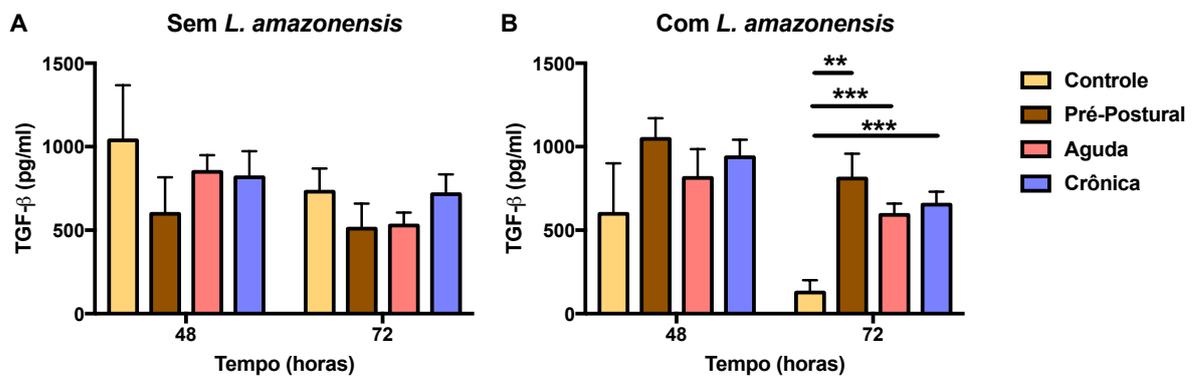


Figura 16: Produção de TGF- β por macrófagos derivados de monócitos de medula. A: concentrações de TGF- β no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: concentrações de TGF- β no sobrenadante de cultura de macrófagos

infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico teste t de Student. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Não foi possível observar entre os grupos experimentais mudanças quanto à atividade de arginase entre os grupos experimentais (figura 17). Houve aumento, em todos os grupos, de atividade de arginase a partir de 48 horas em relação ao anterior. Nas células não infectadas por *L. amazonensis*, ocorreu um discreto aumento nos grupos de fase aguda e crônica no tempo de 72 horas comparado ao de 48 horas (figura 17A), enquanto, em células infectadas, esse leve aumento foi notado nos macrófagos recuperados de animais não infectados ou em fase pré-postural da infecção por *S. mansoni*.

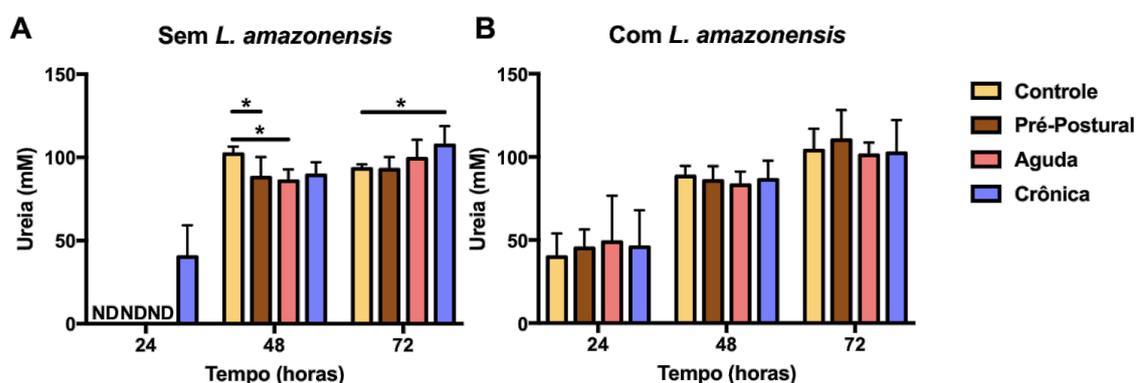


Figura 17: Atividade de arginase no sobrenadante de macrófagos derivados de monócitos de medula. A: atividade de arginase no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: atividade de arginase no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * $p < 0,05$. ND: não detectável.

A diferença mais marcante encontrada na atividade de arginase foi observada entre macrófagos infectados e não infectados. A infecção por *L. amazonensis*, no tempo de 24 horas, foi responsável por promover atividade dessa enzima nos grupos controle, pré-postural e agudo, os quais tiveram níveis indetectáveis no sobrenadante de células não infectadas pelo protozoário.

As concentrações de óxido nítrico são apresentadas na figura 18. Macrófagos não infectados com *L. amazonensis* (figura 18A) apresentam comportamento diferente quanto a

esse marcador de inflamação em relação a células infectadas (figura 18B), tendo estas vindo ou não de animais com *S. mansoni*. Macrófagos de medula de todos os grupos, tanto de animais não infectados quanto infectados, apresentaram níveis semelhantes de óxido nítrico nas primeiras 24 horas.

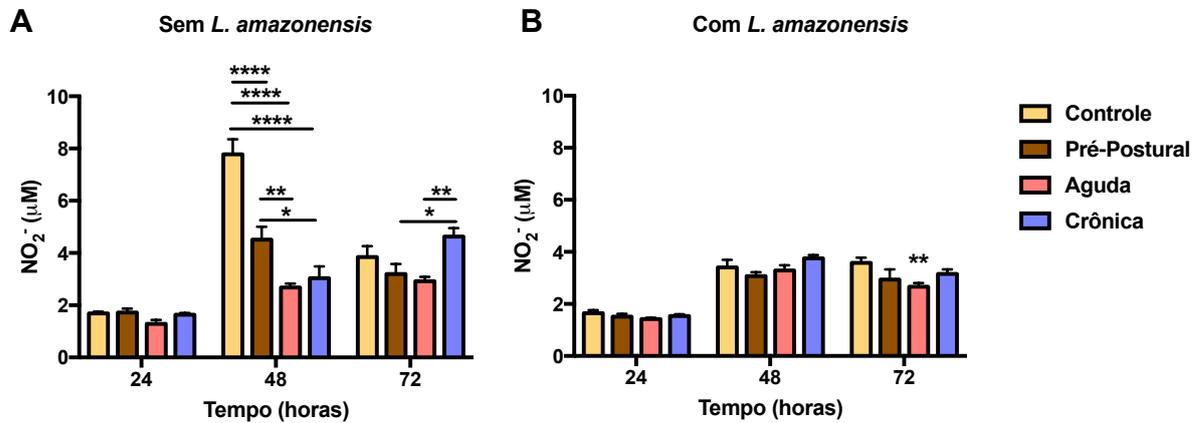


Figura 18: Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de monócito de medula. A: dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos não infectados com *L. amazonensis*. B: dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-Way ANOVA. Colunas representam média \pm erro padrão. * representa diferença significativa entre grupos diferentes em um mesmo tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Quando não infectados com *L. amazonensis*, macrófagos de animais não infectados com *S. mansoni* apresentaram pico de produção de NO com 48 horas de cultura ($7,778 \pm 0,5766 \mu\text{M}$), a qual diminuiu com 72 horas ($3,843 \pm 0,4184 \mu\text{M}$), mas continuou elevada em relação a 24 horas ($1,689 \pm 0,0687 \mu\text{M}$; $p < 0,0001$). Padrão semelhante foi seguido por células de animais em fase pré-postural. Nas células de animais com infecção aguda, houve aumento com 48 ($2,683 \pm 0,1492 \mu\text{M}$) em relação a 24 horas ($p < 0,0001$), mas os níveis foram mantidos às 72 horas. Macrófagos derivados de animais em infecção crônica de *S. mansoni* e não infectados por *Leishmania*, apresentaram aumento progressivo da produção de óxido nítrico entre 24 e 72 horas.

Comparando os diferentes grupos experimentais, foi observado que, após 48h de cultivo, a produção de NO por macrófagos derivados de animais controle (sem esquistossomose) foi significativamente maior do que em todos os outros grupos não infectados com *L. amazonensis* (pré-postural: $4,509 \pm 0,4916 \mu\text{M}$; agudo: $2,683 \pm 0,1492 \mu\text{M}$;

crônico: $3,034 \pm 0,4503 \mu\text{M}$; $p < 0,0001$ para todos). Neste mesmo período, macrófagos derivados de animais com esquistossomose pré-postural tiveram concentrações de óxido nítrico menores somente que o grupo controle, mas maiores que os recuperados de animais em fase aguda ($p = 0,0013$) e crônica ($p = 0,0128$), sendo as destes grupos semelhantes entre si. Quando a medida de NO foi realizada após 72h de cultivo não houve diferença significativa entre os grupos controle ($3,843 \pm 0,4184 \mu\text{M}$) e os de infecção pré-postural ($3,195 \pm 0,3837 \mu\text{M}$) e aguda ($2,923 \pm 0,1672 \mu\text{M}$). A produção de óxido nítrico pelos macrófagos de animais em fase crônica ($4,633 \pm 0,3207 \mu\text{M}$) foi maior que nos grupos pré-postural ($p = 0,0160$) e agudo ($p = 0,0029$).

Já os macrófagos de todos os grupos, quando infectados com *L. amazonensis*, tiveram aumento na produção de óxido nítrico às 48 horas de infecção, cujos níveis se mantiveram com 72 horas. Diferentemente das não infectadas com *L. amazonensis*, essas células não apresentaram diferenças significativas entre as fases de infecção por *S. mansoni*, incluindo o controle, no tempo de 48 horas. Às 72 horas após a infecção por *L. amazonensis*, a única diferença encontrada foi na concentração e óxido nítrico dos macrófagos derivados de animais com esquistossomose aguda ($2,662 \pm 0,1465 \mu\text{M}$) em relação aos dos animais não infectados por *S. mansoni* ($3,583 \pm 0,194 \mu\text{M}$; $p = 0,0071$).

7 DISCUSSÃO

O perfil ativação de macrófagos tem sido associado ao seu estado de susceptibilidade ou resistência à infecção por parasitos do gênero *Leishmania* (INIESTA *et al.*, 2001; MUKBEL *et al.*, 2007; ALEXANDER & BROMBACHER, 2012; MUXEL *et al.*, 2018a). A exposição dessas células a diferentes microambientes induz a ativação de fenótipos diferentes, cujas respostas divergem frente a um mesmo estímulo (ERWIG *et al.*, 1998; MONTAVANI *et al.*, 2004; STOUT *et al.*, 2005; MARTINEZ & GORDON, 2014).

Ao analisar a influência que a infecção por *S. mansoni* teria nesse processo, o presente trabalho revelou que macrófagos recuperados de medula óssea de animais na fase aguda da esquistossomose são mais permissivos ao crescimento intracelular de *L. amazonensis*, sendo que o aumento da susceptibilidade destes macrófagos foi acompanhado por menor produção de óxido nítrico por essas células. Além disso, macrófagos de diferentes fases apresentam capacidades alteradas de ativar resposta imune adaptativa devido à alta produção de TGF- β , assim como de recrutar outras células imunes para o local de infecção graças às mudanças no perfil de produção das quimiocinas CXCL2, CCL5 e CCL24.

A maioria dos trabalhos envolvendo coinfeção *Schistosoma/Leishmania* que avaliaram a susceptibilidade de células à infecção *in vitro* por *Leishmania* sp., seja em animais experimentais ou células de humanos, usaram células de compartimentos que não da medula óssea. O uso de células já diferenciadas do peritônio (LA FLAMME *et al.*, 2002) pode não refletir bem o perfil de células recrutadas para o sítio de infecção por *Leishmania* sp. (ROMANO *et al.*, 2017). Esse problema não é presente em trabalhos que utilizaram células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico, que podem representar um modelo mais fiel ao que ocorre *in vivo* (LOPES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019).

A medula óssea é de enorme importância para a resposta inflamatória induzida em respostas alérgicas, resposta a tumores e à própria infecção por *S. mansoni*. (WOOD *et al.*, 1998; RENDETE *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2019). Dela originam-se vários tipos celulares, incluindo linfócitos T, linfócitos B e macrófagos que participam da formação do granuloma hepático, sendo que monócitos e macrófagos derivados da medula óssea apresentam papel importante para regulação da resposta granulomatosa na esquistossomose, modulando o quadro clínico em camundongos (AZEVEDO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2019).

O diferencial do presente trabalho se dá, portanto, na utilização de macrófagos

derivados de medula óssea. Isso reforça que a influência da infecção por *S. mansoni* na ativação dessas células se dá em um ponto muito antes dessas células atingirem a circulação, aspecto muito importante da biologia e patologia desse parasito, aspecto abordado somente uma outra vez na literatura (JOSHI *et al.*, 2008). Além disso, estudos em humanos analisaram a susceptibilidade de células dendríticas de indivíduos coinfectados a *L. braziliensis* (LOPES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019), enquanto este trabalho estuda qual a influência da infecção por *S. mansoni* em macrófagos recém diferenciados, células extremamente importantes para o ciclo de vida de *Leishmania* sp. (LAWYER *et al.*, 1990; ROMANO *et al.*, 2017), incluindo *L. amazonensis*, espécie de importância clínica no País (BARRAL *et al.*, 1991; SCORZA *et al.*, 2017).

Ovos de *S. mansoni*, cujos antígenos são indutores de resposta de perfil Th-2 (OKANO *et al.*, 2001; EVERTS *et al.*, 2009, WHITE & ARTAVANIS-TSAKONAS, 2012), são capazes de induzir alterações em células de medula óssea. Joshi *et al.* (2008) demonstrou que a injeção direta de ovos intraperitoneal e intravenosamente induziu um perfil M2 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea *in vitro*, com maior expressão de FIZZ-1, ST2, IL-10 e arginase-1, enquanto as expressões de CCL3, NOS2, TNF- α , IL-12p70, CXCL2, TLR2, TLR3 e TLR4 foram reduzidas.

Em humanos infectados com *L. major*, menores níveis de TLR2 e TLR4, assim como polimorfismos no gene de TLR4, foram encontrados em indivíduos com lesões que não cicatrizavam (AJDARY *et al.*, 2011; TOLOUEI *et al.*, 2013). Isso pode sugerir que, a menor expressão desses receptores em macrófagos induzida por infecção com *S. mansoni* (JOSHI *et al.*, 2008) também tenha relação com o parasitismo nessas células ou o desfecho clínico da leishmaniose tegumentar (KROPF *et al.*, 2004; GUERRA *et al.*, 2010; TOLOUEI *et al.* 2013; MUXEL *et al.*, 2018b).

7.1 A infecção por *S. mansoni* durante a fase aguda diminui a capacidade de macrófagos de medula óssea de controlarem a infecção por *L. amazonensis*

A infecção por *S. mansoni*, em nenhuma das fases, se mostrou capaz de alterar a porcentagem de macrófagos infectados *in vitro* por *L. amazonensis*, tanto 48 como 72 horas após a infecção. Esses resultados estão de acordo com aqueles de La Flamme e colaboradores (2002), em que a infecção de macrófagos peritoneais de animais na fase aguda da esquistossomose não os deixou mais nem menos susceptíveis a infecção por *L. major*.

No entanto, deve ser ressaltado que La Flamme *et al.* (2002) não avaliou outros

parâmetros parasitológicos, os quais foram avaliados neste trabalho. Ao analisar a carga de amastigotas nos macrófagos, foi possível observar que a infecção aguda por *S. mansoni* foi, sim, capaz de tornar esses macrófagos mais permissíveis. Esse resultado correspondeu ao esperado, já que a fase aguda da esquistossomose é caracterizada por uma resposta prevalentemente Th-2, a qual favorece o crescimento intracelular de *Leishmania* sp. (ALEXANDER *et al.*, 2002; DUNNE & COOKE, 2005; HAMS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SCOTT & NOVAIS, 2016)

Possivelmente, já que a diferença foi somente na quantidade de amastigotas por macrófago, e não na porcentagem de células infectadas, essa diferença não se deve à capacidade do parasito de invadir as células, mas sim à de multiplicar-se dentro delas. Isso é reforçado pelo fato de que, no tempo de 48 horas, não houve diferença significativa entre outros grupos em nenhum dos parâmetros parasitológicos avaliados. Fenômeno semelhante já foi observado, em que a promoção de autofagia em macrófagos levou à proliferação intracelular *L. amazonensis* e *L. major*, mas não da taxa de infecção dos macrófagos (DIAS *et al.*, 2018).

Outro fator que deve ser levado em consideração é a forma como os macrófagos utilizados por La Flamme *et al.* (2002) foram recuperados. A recuperação de macrófagos peritoneais estimulados por ovos de *S. mansoni*, cujos antígenos excretados e secretados são grandes indutores de resposta Th-2 (EVERTS *et al.*, 2009, WHITE & ARTAVANIS-TSAKONAS, 2012), pode ter afetado o perfil de ativação dessas células. O uso de diferentes esquemas de estímulo para recuperação de macrófagos peritoneais já foi associado à obtenção de populações diferentes de macrófagos, com diferentes padrões de resposta a um mesmo antígeno (GHOSN *et al.*, 2010). Macrófagos recuperados de maneiras diversas também respondem diferentemente a fármacos utilizados para tratamento de *Leishmania* sp. (SEIFERT *et al.*, 2010).

O uso de macrófagos derivados da medula óssea para estudo de susceptibilidade à infecção por *Leishmania* sp. se torna principalmente relevante quando são considerados estudos recentes, que mostram que *L. major* preferencialmente infecta células do sistema fagocítico mononuclear recém infiltradas e diferenciadas, e não macrófagos residentes (ROMANO *et al.*, 2017). Em outros modelos, como o peritônio, os macrófagos recuperados sem estimulação são majoritariamente residentes, enquanto os estimulados já sofrem alterações de seu perfil de ativação antes de serem usados nos experimentos (GHOSN *et al.*, 2010). Desta forma, o uso de macrófagos diferenciados de medula óssea, como no presente estudo, pode servir como um modelo mais adequado para estudos utilizando essas células.

Mesmo que níveis de atividade de arginase no sobrenadante de culturas, ainda que infectadas com *L. amazonensis*, tenham sido semelhantes entre os grupos, é provável que essa não seja a principal via pela qual a susceptibilidade de macrófagos é alterada na fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Entretanto, deve ser levado em consideração que o método para dosagem de atividade dessa enzima no sobrenadante pode não ser o mais adequado, podendo ser outros métodos, como dosagem em lisado (INIESTA *et al.*, 2001) ou PCR (JOSHI *et al.*, 2008), mais precisos em revelar sua importância no modelo de coinfeção utilizado nesse trabalho.

O aumento expressivo do número de amastigotas por macrófagos de animais na fase aguda da esquistossomose no tempo de 72 horas em relação aos outros grupos e ao tempo de 48 horas pode ser atribuído à menor capacidade desses macrófagos de produzir óxido nítrico, tóxico para *Leishmania* sp. (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1991; MUKBEL *et al.*, 2007). No entanto, as concentrações de óxido nítrico detectadas em todos os grupos, relativamente baixas, podem não ser capazes de matar as amastigotas (GREEN *et al.*, 1990), mas serem de indicação do perfil de ativação dessas células. De outro lado, não se pode excluir a possibilidade do envolvimento de espécies reativas de oxigênio no controle do parasito (MUKBEL *et al.*, 2007), apesar de que estas parecem não ter relevância direta no controle *in vivo* da infecção por *L. amazonensis* (ROMA *et al.*, 2016).

Quando se comparam os macrófagos de animais não infectados com os de animais em fase pré-postural, foi possível observar que a infecção por *L. amazonensis* levou a menores níveis de NO. A diminuição de NO em macrófagos infectados por *L. amazonensis* acontece de forma independente de IL-4, IL-10 e TGF- β (BALESTIERI *et al.*, 2002). Entre os mecanismos de evasão do parasito, estão a inibição da transcrição de iNOS por supressão de NF- κ B p50/50 e indução de deacetilases de histonas, favorecendo o crescimento das amastigotas, e até mesmo utilizar-se de grandes vacúolos parasitóforos para reduzir efeitos do estresse oxidativo (WILSON *et al.*, 2008; CALEGARI-SILVA *et al.*, 2015; CALEGARI-SILVA *et al.*, 2018). É possível, então, que *L. amazonensis* se aproveite desses mecanismos, e consiga efetuar-los de forma mais eficiente em macrófagos durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*.

Joshi *et al.* (2008) mostraram que a estimulação com ovos de *S. mansoni* reduziu a expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos recuperados de medula óssea. Lipofosfoglicanos (LPG) de *L. major* são bem estabelecidos como agonistas de TLR2 (DE VEER *et al.*, 2003), mas seu papel na resposta a *L. amazonensis* aparenta ser de susceptibilidade *in vivo*, mas protetora *in vitro* (GUERRA *et al.*, 2010; MUXEL *et al.*,

2018b). Já TLR4, além de redução da sua expressão, apresentou respostas diferentes a LPS, agonista de TLR4, com o aumento da expressão de arginase em relação a células de animais não estimuladas (JOSHI *et al.*, 2008). TLR4 também é relacionado à resposta protetora contra *L. major* e *L. amazonensis*, *in vitro* e *in vivo* (KROPF *et al.*, 2004; MUXEL *et al.*, 2018b). Logo, a expressão diferencial desses receptores e diferenças na suas vias quando da estimulação por ovos de *S. mansoni*, também pode ser responsável pelo favorecimento da proliferação do parasito em macrófagos de animais recuperados nessa fase.

7.2 Diferentes fases da infecção por *S. mansoni* modulam a capacidade de macrófagos de induzir resposta adaptativa

Além da expressão de moléculas efetoras, como óxido nítrico e arginase, os macrófagos também apresentam grande importância na indução da resposta imune adaptativa (MANTOVANI *et al.*, 2004; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014). Diferentes perfis de macrófago expressam diferentemente citocinas e quimiocinas, que ativam e recrutam diversas células, como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos B e diferentes subpopulações de linfócitos T (MANTOVANI *et al.*, 2004; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014).

Ao contrário do achado em outros artigos (LOPES *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019), a expressão de IL-10 neste trabalho não foi significativamente alterada pela infecção prévia por *S. mansoni*. Essa divergência pode ter sido devido à utilização nesses trabalhos de células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos. Por outro lado, estudo apresentado por Joshi *et al.* (2008) também mostra que expressão de IL-10 em macrófagos derivados de medula óssea foi semelhante entre animais não infectados e infectados na fase aguda da esquistossomose. Entretanto, é importante salientar que macrófagos não são os principais produtores de IL-10 na leishmaniose, sendo células Treg a principal fonte dessa citocina (SCHWARZ *et al.*, 2013). Em camundongos C57BL/6 deficientes para essa citocina não apresentam diferenças na progressão da infecção por *L. amazonensis* (JONES *et al.*, 2002). No entanto, a participação de IL-10 e os seus efeitos no desenvolvimento da LTA durante coinfeção com *S. mansoni* não devem ser descartados, haja vista sua importância no tratamento (BOURREAL *et al.*, 2001) e em manifestações mais graves da doença (BRODSKYN *et al.*, 1997; BACELLAR *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005).

De outro lado, foram evidenciadas diferenças nos níveis de TGF- β após em macrófagos derivados de medula óssea de todos os animais infectados por *S. mansoni* em relação ao controle, quando estas células foram infectados *L. amazonensis in vitro*.

Nossos dados mostraram que a infecção pelo protozoário em macrófagos derivados de animais com esquistossomose não resultou em modulação da produção de TGF- β observada durante a infecção de macrófagos derivados de animais sem esquistossomose.

Com o início da oviposição de *S. mansoni*, começa a indução de uma resposta de perfil Th-2 aos ovos do parasito, assim como uma resposta regulatória, que se torna predominante na fase crônica da infecção, o que promove diferenciação de macrófagos em M2, incluindo M2c, produtores de TGF- β (DUNNE & COOKE, 2005; LAYLAND *et al.*, 2007; JOSHI *et al.*, 2008; ZACCONE *et al.*, 2009; HAEBERLEIN *et al.*, 2017). Apesar de virem de um ambiente predominantemente Th-1, os macrófagos de animais de fase pré-postural apresentaram o mesmo comportamento que os outros grupos infectados quanto à produção de TGF- β . Mesmo que os níveis dessa citocina aumentem mais representativamente na fase crônica da esquistossomose, foi mostrado que a resposta regulatória, e não a resposta Th-2, é a principal responsável pela modulação da resposta Th-1 na fase pré-postural esquistossomose, sendo também desenvolvida durante esse início da infecção (HESSE *et al.*, 2004). Além disso, TGF- β desempenha papéis na maturação sexual tanto de machos quanto de fêmeas de *S. mansoni*, apresentando importância ainda na fase pré-postural da infecção no hospedeiro vertebrado (OSMAN *et al.*, 2006; GALANTI *et al.*, 2012; LEUTNER *et al.*, 2013). Como TGF- β é uma citocina de grande importância para indução de resposta regulatória, seus níveis aumentados em todos os grupos, independentemente da fase de infecção de *S. mansoni*, podem levar à maior produção de IL-10 por outros tipos celulares que não macrófagos no sítio de infecção por *L. amazonensis* (LAYLAND *et al.*, 2007; ZACCONE *et al.*, 2009; HAEBERLEIN *et al.*, 2017). Como possível consequência, já foi relatado que a maior expressão de IL-10 em lesões de indivíduos com LTA são correlacionados à falha terapêutica (BOURREAU *et al.*, 2001).

Por outro lado, TNF- α , uma citocina que apresenta papel na ativação clássica de macrófagos, é associada ao controle da infecção e desenvolvimento de lesões cutâneas (LIEW *et al.*, 1990; POLARI *et al.*, 2019). Quanto aos níveis indetectáveis de TNF- α em todos os grupos analisados, conforme também foi visto por Joshi *et al.* (2008), apesar de não permitirem muitas suposições, é necessário destacar que essa citocina não aparenta ser tão importante para o controle da carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos quanto é para de outras espécies, como *L. major* e *L. (L.) infantum* (LIEW *et al.*, 1990; CARMO *et al.*, 2010).

7.3 A expressão de quimiocinas e capacidade de macrófagos em recrutar células são modificadas durante a infecção por *S. mansoni*

Para a leishmaniose, quimiocinas são essenciais para o desenvolvimento de resposta imune efetiva pelo recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Neste trabalho, a expressão de quimiocinas também apresentou diferenças entre as fases de infecção de *S. mansoni*. CXCL2, CCL5 e CCL24 tiveram seus níveis alterados entre os grupos, enquanto CCL17 não foi detectável em nenhuma das amostras.

Os níveis de CXCL2 variaram bastante, tanto entre as fases da infecção de *S. mansoni* em quais as células foram recuperadas, como quando foram infectadas com *L. amazonensis*. Como esperado por ser expressa em ambientes pró-inflamatórios, seus níveis mais altos em células foram detectados em macrófagos vindos de animais não infectados ou na fase pré-postural (JI *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2004). Animais deficientes para IL-10 e IL-4 apresentam níveis maiores dessa quimiocina quando infectados por *L. major*, o que explica sua detecção, baixa e em um único momento, em macrófagos de fase crônica, e sua não detecção em nenhum tempo em macrófagos de fase aguda (JI *et al.*, 2003; PEARCE *et al.*, 2004; DUNNE & COOKE, 2005).

Durante a infecção por *L. amazonensis*, ocorre pequena e tardia produção de CXCL2 quando comparada a *L. major*, e sua produção aumenta com transferência de linfócitos Th-1 para animais infectados com *L. amazonensis* (JI *et al.*, 2003). No presente trabalho, a infecção *L. amazonensis* promoveu redução dos níveis dessa quimiocina, tendo expressão em todos os grupos somente no tempo de 72 horas.

CXCL2 é responsável, principalmente, pelo recrutamento de neutrófilos, as primeiras células a infiltrarem no local de infecção de *Leishmania* sp. (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005; PETERS *et al.*, 2008; ROMANO *et al.*, 2017). Os papéis dessas células na leishmaniose são vários, dependendo da espécie de *Leishmania* e da fase da infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; MANTOVANI *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005; PETERS *et al.*, 2008; CARLSEN *et al.*, 2015; REGLI *et al.*, 2017; ROMANO *et al.*, 2017).

Nos momentos iniciais da infecção, de acordo com o modelo de cavalo-de-Troia, neutrófilos podem servir de células hospedeiras intermediárias para *L. major*, albergando promastigotas até a infiltração de monócitos inflamatórios, principal célula hospedeira do protozoário (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008; ROMANO *et al.*, 2017). A infecção destas células é favorecida pela fagocitose de neutrófilos em fases iniciais

de apoptose, facilitando a infecção pela inibição da ativação clássica de macrófagos, o que cria um ambiente favorável ao crescimento do parasito (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; AFONSO *et al.*, 2008). Afonso *et al.* (2008) mostraram que, assim como a fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados favorece o estabelecimento de *L. major* dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004), a interação entre neutrófilos apoptóticos com macrófagos infectados favorece o crescimento de *L. amazonensis* quando já dentro destas células. Além disso, amastigotas de *L. amazonensis* são mais resistentes à eliminação por neutrófilos (CARLSEN *et al.*, 2013).

No entanto, promastigotas de *L. amazonensis* parecem não interagir com neutrófilos da mesma forma, sendo mais susceptíveis ao controle exercido por esse tipo celular (CARLSEN *et al.*, 2013; GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2014). Assim, na infecção por *L. amazonensis*, neutrófilos apresentam um papel protetor, auxiliando no controle da carga parasitária e limitando desenvolvimento de lesões durante as primeiras semanas (SOUSA *et al.*, 2014). A interação de neutrófilos com macrófagos infectados, por meio de secreções como elastase neutrofílica e fator de ativação plaquetária, diminui a carga parasitária de *L. amazonensis*, evidenciando função de neutrófilos no controle do parasito quando já nas células do sistema fagocítico mononuclear (CARMO *et al.*, 2010).

Curiosamente, nossos dados mostram que após a infecção por *L. amazonensis*, macrófagos derivados de animais em fase crônica da esquistossomose apresentaram níveis elevados de CXCL2 em todos os tempos observados. Em um primeiro momento, levando em consideração o exposto aqui, isso pode indicar um favorecimento no controle do protozoário nesse momento da infecção por *S. mansoni*. No entanto, outros fatores do microambiente devem ser levados em consideração, pois os neutrófilos também apresentam interações prejudiciais para o hospedeiro durante a infecção por *L. amazonensis*.

Fridlender *et al.*, (2010), em modelos tumorais, mostraram que as populações de neutrófilos recrutadas na presença de TGF- β têm um fenótipo favorável ao crescimento de tumores, que produzem baixos níveis de espécies reativas de oxigênio e inibem a atividade citotóxica de células T CD8⁺. Com a alta produção dessa citocina por macrófagos recuperados na fase crônica infectados com *L. amazonensis*, é possível que, em um microambiente com altos níveis de TGF- β e CXCL2, os neutrófilos recrutados favoreçam o crescimento do parasito (FARIA *et al.*, 2009; NOVAIS & SCOTT, 2015). No entanto, mais estudos são necessários para verificar o perfil dos neutrófilos recrutados nesse caso.

Além do mais, o próprio recrutamento de neutrófilos por CXCL2 pode ser afetado de acordo com o ambiente inflamatório. Em um ambiente predominantemente regulatório,

como na infecção crônica por *S. mansoni*, há menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (DUNNE & COOKE, 2005; TAYLOR *et al.*, 2006). Sendo a expressão de CXCR2, receptor de CXCL2, dependente de IFN- γ , uma baixa produção dessa citocina acarreta menor expressão do receptor em neutrófilos (LIMA *et al.*, 2017). A baixa expressão de CCL5 e altos níveis de TGF- β na fase crônica, indicando uma menor eficiência no recrutamento de células Th-1 e na indução de resposta pró-inflamatória, corroboram essa hipótese.

Outro fator a ser considerado é que CXCL2 é uma quimiocina relacionada à angiogênese em tumores (TOULZA *et al.*, 2005). Como consequência de obstrução de vasos e hipertensão portal, parte da patologia da esquistossomose é relacionada à formação de circulação colateral, levando a complicações como varizes esofagianas, hematótese, ascite e hemorragia (RICHTER *et al.*, 1998; ANDRADE & SANTANA, 2010; GRYSEELS, 2012). Portanto, não se pode ignorar os efeitos que a coinfeção *in vivo* teria também sobre a clínica da própria esquistossomose, já que *L. amazonensis* também é encontrada no fígado em alguns modelos experimentais, e já foram relatados alguns casos dessa espécie causando manifestações viscerais em humanos (BARRAL *et al.*, 1991; CELESTE *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2018).

Já a expressão de CCL5 correspondeu ao esperado, principalmente levando em consideração as células recuperadas de animais em fase pré-postural, pois a resposta predominantemente Th-1 levaria à diferenciação para M1, produtores dessa quimiocina (MENSON & WILSON, 1989; MANTOVANI *et al.*, 2004; DUNNE & COOKE, 2005). CCL5 é detectável no soro de indivíduos infectados com *S. mansoni* mesmo após o período pré-patente (CASTRO *et al.*, 2018), assim como foram encontrados níveis dessa citocina no sobrenadante de macrófagos não infectados de fase crônica em todos os tempos e em fase aguda, a não ser no tempo de 72 horas. Concentrações mais elevadas de CCL5 são encontradas no soro de humanos em fase crônica com alta carga parasitária em comparação a não infectados (FALCÃO *et al.*, 2002), assim como visto com 72 horas de infecção.

Nossos dados mostraram que, após a infecção com *L. amazonensis*, houve aumento da expressão de CCL5 em macrófagos de praticamente todos os grupos, sendo esse aumento mais proeminente após 48 h de cultivo. De acordo, *L. major* induz a expressão de CCL5 nos momentos iniciais da infecção em camundongos, com consequente recrutamento de células CCR5⁺ (MATTE & OLIVER, 2002). Alta produção dessa quimiocina também tem sido associada à resistência a *L. major* em camundongos C57BL/6, assim como, comparativamente, a menor expressão ou bloqueio dessa quimiocina é relacionada à

diminuição da capacidade de montar uma resposta de perfil Th-1 e maior susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* (JI *et al.*, 2003; SANTIAGO *et al.*, 2004).

Em lesões de LTA, CCL5 também aparenta ter relação com manifestações clínicas. Apesar de não ter relação direta, menor infiltrado de células positivas para seu receptor, CCR5, é encontrado em indivíduos com LCDA em comparação a lesões de LCL, sendo aquela uma forma grave e de difícil tratamento, marcada por anergia a *Leishmania* sp. (RITTER *et al.*, 1996; CALVOPINA *et al.*, 2006; ZERPA *et al.*, 2007; CAMPANELLI *et al.*, 2010; CAÑEDA-GUZMAN *et al.*, 2014). A maior expressão de CCL5 em células infectadas por *L. amazonensis* na fase pré-postural, pode levar ao recrutamento de células Th-1, T CD8⁺ e NK, de grande importância para a resposta adaptativa e produtoras de citocinas pró-inflamatórias, acarretando um melhor controle da infecção, mas também maior inflamação e dano tecidual (BELKAID *et al.*, 2002b; MANTONVANI *et al.*, 2004; FARIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PRAJEETH *et al.*, 2011; NOVAIS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Da mesma forma, macrófagos recuperados de animais em fase crônica apresentam menores níveis dessa quimiocina em relação ao controle, o que pode levar a uma pior resposta ao parasito a mais longo prazo (RITTER *et al.*, 1996; CAMPANELLI *et al.*, 2010; CAÑEDA-GUZMAN *et al.*, 2014; SCORZA *et al.*, 2017).

Interessantemente, nas células não infectadas com *L. amazonensis*, CCL24 apresentou sempre níveis inferiores nos macrófagos de animais na fase aguda em comparação aos outros grupos. Tal diferença não era esperada, pois essa quimiocina, também conhecida como eotaxina-2 e expressa predominantemente por macrófagos M2a, é responsável pelo recrutamento de eosinófilos, que compõem boa parte do granuloma nessa fase, além de basófilos e linfócitos Th-2 (MANTOVANI *et al.*, 2014; HAMS *et al.*, 2013).

A infecção por *L. amazonensis* nessas células evidenciou que todos os grupos respondem da mesma forma quanto à expressão de CCL24, levando sua produção a níveis indetectáveis. Apesar de serem poucos os relatos na literatura sobre o papel de CCL24 na leishmaniose (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013), o papel de células Th-2, principalmente pela secreção de IL-4 e IL-13, promovendo a diferenciação de macrófagos em M2a, é bem estabelecido como favorável à multiplicação do parasito (ALEXANDER *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Em contrapartida, maior expressão de CCL24 já foi associada com menores cargas parasitárias de *L. infantum* em cães (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2013). Além do mais, linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. amazonensis* apresentam infiltrado

eosinofílico maior do que em linhagens susceptíveis (CARDOSO *et al.*, 2010). Apesar de serem capazes de matar promastigotas de *Leishmania* sp., ainda são poucas as evidências que eosinófilos tenham alguma participação no controle de amastigotas dentro de macrófagos (GRIMALDI *et al.*, 1984; WATANABE *et al.*, 2004).

Sendo BALB/c uma linhagem susceptível à infecção por *L. amazonensis* (SCOTT & NOVAIS, 2016), é de esperar-se baixos níveis de CCL24 produzidos por macrófagos infectados. Por um lado a supressão da produção de CCL24 em macrófagos infectados pelo protozoário pode ser uma maneira das células hospedeiras prevenirem o recrutamento de linfócitos Th-2, que podem favorecer o crescimento do parasito. Alternativamente, *L. amazonensis* pode ter evoluído para evitar o recrutamento de eosinófilos para o local da infecção, a fim de evadir seus efeitos prejudiciais, mesmo que isso signifique não tirar proveito, por essa via, de linfócitos Th-2. Infelizmente, não é possível fazer inferências, neste trabalho, sobre outras vias para recrutamento dessas células, pelo fato de não ter sido detectada CCL17 nas amostras.

8 CONCLUSÃO

Um resumo das consequências de diferentes fases da infecção por *S. mansoni* na resposta de macrófagos derivados de medula óssea a *L. amazonensis* pode ser visto na figura 19. Os resultados deste trabalho suportam a hipótese de que a infecção de *S. mansoni* é capaz de alterar a maturação de macrófagos desde sua origem na medula óssea, o que leva a perfis diferentes de resposta e susceptibilidade a *L. amazonensis* logo nos momentos iniciais da infecção.

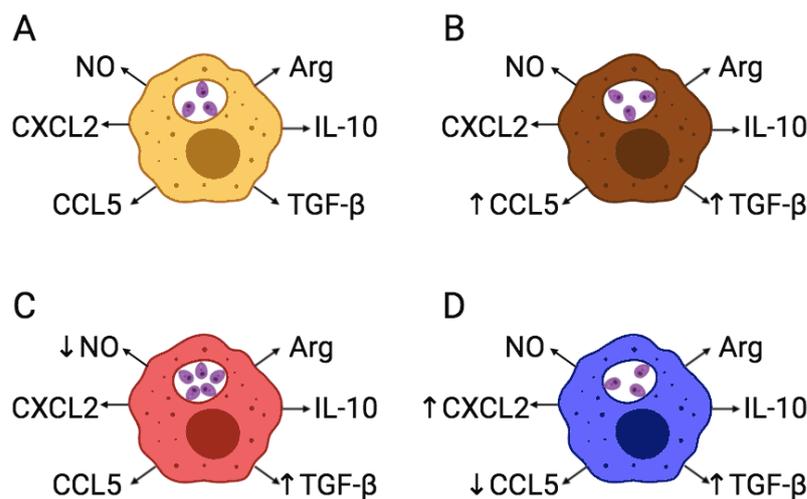


Figura 19: Resumo da produção diferencial de moléculas efetoras, citocinas e quimiocinas, bem como número de amastigotas no tempo de 72 horas após infecção por *L. amazonensis*, em macrófagos diferenciados de medula óssea em diferentes fases de infecção por *S. mansoni*. A: macrófago de controle não infectado. B: macrófago de animal em fase pré-postural. C: macrófago de animal em fase aguda. D: macrófago de animal em fase crônica. Setas indicam maior (↑) ou menor (↓) produção em comparação ao controle não infectado (A). NO: óxido nítrico. Arg: arginase. Fonte: elaborada pelo autor.

As alterações na maturação de macrófagos sofridas durante a fase pré-postural da esquistossomose fazem com que essas células tenham um fenótipo não totalmente M1, mas mais pró-inflamatório que nas outras fases. Isso se dá pelo aumento dos níveis de CCL5 e pela manutenção de níveis altos de TGF-β.

Durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*, foram notadas as mudanças mais imediatas na capacidade de responder a *L. amazonensis*. Essas células permitiram maior proliferação intracelular de amastigotas, provavelmente devido à redução da produção de

óxido nítrico. Como os níveis de outros marcadores de M2, como atividade de arginase e IL-10, continuam semelhantes ao controle, é capaz que essas células tenham sua polarização para M1 dificultada frente à infecção por *L. amazonensis*, mais do que propriamente uma polarização para M2.

Já na fase crônica, apesar do número de amastigotas não ter sido maior em comparação ao controle, não é possível descartar efeitos a longo prazo que possam favorecer *L. amazonensis*. O nível elevado de TGF- β e baixo de CCL5 indicam que essas células podem não ser eficientes quando se trata de montar uma resposta Th-1, o que pode permitir a proliferação do protozoário.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes fases da infecção por *S. mansoni* influenciam de forma diferente na maturação de macrófagos a partir de seus precursores na medula óssea. Cada uma dessas populações de macrófagos responde de forma diferenciada à infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, o que pode levar a diferentes desfechos clínicos de LTA na coinfeção por esses parasitos. Sendo assim, este trabalho destaca ainda mais a importância do estudo de coinfeções.

Apesar deste estudo oferecer uma nova visão sobre as consequências da infecção por *S. mansoni* no parasitismo de *L. amazonensis*, muito ainda precisa ser esclarecido. Os mecanismos pelos quais *S. mansoni* afeta a maturação de células do sistema fagocítico mononuclear ainda na medula óssea permanecem a ser desvendados, assim como quais são as alterações sofridas por essas células, gerando os fenótipos aqui observados.

Experimentos *in vivo* podem oferecer uma visão mais ampla e fiel dos processos aqui descritos, assim auxiliando na elucidação de mecanismos pelos quais a infecção por *S. mansoni* afeta o desenvolvimento de macrófagos e que efeitos isso tem no parasitismo e morbidade causada por *L. amazonensis* a longo prazo. De forma semelhante, seria interessante averiguar como a infecção por *S. mansoni* afeta outras espécies de *Leishmania* de relevância clínica no País, como *L. braziliensis* e *L. infantum*. Além disso, são poucos os estudos que abordam a influência da infecção por *Leishmania* sp. na biologia de *S. mansoni*, o que também vale ser explorado.

REFERÊNCIAS

- AFONSO L, BORGES VM, CRUZ H, RIBEIRO-GOMES FL, DOS REIS GA, DUTRA AN, CLARÊNCIO J, DE OLIVEIRA CI, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN CI 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukocyte Biol* 84: 389-396.
- AGRAWAL S, AGRAWAL A, DOUGHTY B, GERWITZ A, BLENIS J, VAN DYKE T, PULENDRAN B 2003. Cutting edge: different toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 171: 4984-4989.
- AJDARY S, GHAMILOUIE MM, ALIMOHAMMADIAN MH, RIAZI-RAD F, PAKZAD SR 2011. Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 13: 226-231.
- AKUFFO H, COSTA C, VAN GRIENSVEN J, BURZA S, MORENO J, HERRERO M 2018. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006375.
- ALEXANDER J, BROMBACHER F 2012. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol* 3: 1-13.
- ALEXANDER J, BROMBACHER F, MCGACHY HA, MCKENZIE AN, WALKER W, CARTER KC 2002. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol* 32: 2923–2933.
- ALLEN JE, WYNN TA 2011. Evolution of Th2 Immunity: A Rapid Repair Response to Tissue Destructive Pathogens. *PLoS Pathog* 7: e1002003.
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M, WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- AMARAL KB, SILVA TP, DIAS FF, MALTA KK, ROSA FM, COSTA-NETO SF, GENTILE R, MELO RCN 2017. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS One* 12: e0184969.

- AMATO VS, TUON FF, SIQUEIRA AM, NICODEMO AC, NETO VA 2007. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 77: 266-274.
- ANDERSSON J, TRAN DQ, PESU M, DAVIDSON TS, RAMSEY H, O'SHEA JJ, SHEVACH EM 2008. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 205: 1975-1981.
- ANDRADE ZA, SANTANA TS 2010. Angiogenesis and schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 436-439.
- ANGELI V, FAVEEUW C, ROYE O, FONTAINE J, TEISSIER E, CAPRON A, WOLOWCZUK I, CAPRON M, TROTTEIN F 2001. Role of the Parasite-Derived Prostaglandin D₂ in the Inhibition of Epidermal Langerhans Cell Migration during Schistosomiasis Infection. *J Exp Med* 193: 1135-1148.
- ARMSTRONG JC. Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J Parasitol* 51: 605-616.
- AZEREDO-COUTINHO RBG, PIMENTEL MI, ZANINI GM, MADEIRA MF, CATALDO JI, SCHUBACH AO, QUINTELLA LP, DE MELLO CX, MENDONÇA SCF 2016. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* 154: 42-49.
- AZEVEDO CM, SOUZA BSF, DE OLIVEIRA SA, PAREDES BD, BARRETO ES, ALMEIDA NETO H, DOS SANTOS RR, SOARES MBP 2015. Bone marrow-derived cells migrate to the liver and contribute to the generation of different cell types in chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Ex Parasitol* 159: 29-36.
- BACELLAR O, FARIA D, NASCIMENTO M, CARDOSO TM, GOLLOB KJ, DUTRA WO, SCOTT P, CARVALHO EM 2009. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 200: 75-78.
- BACELLAR O, LESSA H, SCHRIEFER A, MACHADO P, JESUS AR, DUTRA WO, GOLLOB KJ, CARVALHO EM 2002. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.
- BADARÓ R, JOHNSON WD, JR 1993. The role of interferon- in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 167: S13-S17.
- BAFICA AMB, CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, LOUKAS A, GOES A, OLIVEIRA RR, CARVALHO EM, ARAUJO MI 2012. Chances in T-Cell and Monocyte Phenotypes *In Vitro*

by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. J Parasitol Res 2012: 1-10.

BAFICA AMB, CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, LOUKAS A, VARELA GT, OLIVEIRA RR, BACELLAR O, CARVALHO EM, ARAUJO MI, 2011. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 106: 856-863.

BALESTIERI FMP, QUEIROZ ARP, SCAVONE C, COSTA VMA, BARRAL-NETTO M, ABRAHAMSOHN IA 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. Microbes Infect 4: 23-29.

BARBOSA MA, PELLEGRINO J, COELHO PMZ, SAMPAIO LBM 1978. QUANTITATIVE ASPECTS OF THE MIGRATION AND EVOLUTIVE ASYNCHRONISM OF *SCHISTOSOMA MANSONI* IN MICE. Rev Inst Med Trop 20: 121-132.

BARRAL A, COSTA JM, BITTENCOURT AL, BARRAL-NETTO M, CARVALHO EM 1995b. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: Clinical and immunopathologic aspects. Int J Dermatol 34: 474-479.

BARRAL A, GUERREIRO J, BOMFIM G, CORREIA D, BARRAL-NETTO M, CARVALHO EM 1995a. Lymphadenopathy as the First Sign of Human Cutaneous Infection by *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg 53: 256-259.

BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, GRIMALDI JUNIOR G, MOMEN H, MCMAHON-PRATT D, DE JESUS AR, ALMEIDA R, BADARO R, BARRAL-NETTO M, CARVALHO EM, JOHNSON JUNIOR WD 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 44: 536-546.

BATES PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 37: 1097-1106.

BATES PA 2018. Revising *Leishmania*'s life cycle. Nat Microbiol 3: 529-530.

BELKAID Y, HOFFMANN KF, MENDEZ S, KAMHAWI S, UDEY MC, WYNN TA, SACKS DL 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med 194: 1497-1506.

- BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S, SHEVACH EM, SACKS DL 2002a. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502–507.
- BELKAID Y, VON STEBUT E, MENDEZ S, LIRA R, CALER E, BERTHOLET S, UDEY MC, SACKS D 2002b. CD8⁺ T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168: 3992-4000.
- BOAVENTURA VS, SANTOS CS, CARDOSO CR, DE ANDRADE J, DOS SANTOS WL, CLARÊNCIO J, SILVA JS, BORGES VM, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN CI, BARRAL A 2010. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 40: 2830-2836.
- BOMFIM G, ANDRADE BB, SANTOS S, CLARÊNCIO J, BARRAL-NETTO M, BARRAL A 2007. Cellular Analysis of Cutaneous Leishmaniasis Lymphadenopathy: Insights into the Early Phases of Human Disease. *Am J Trop Med Hyg* 77: 854-859.
- BOMFIM G, NASCIMENTO C, COSTA J, CARVALHO EM, BARRAL-NETTO M, BARRAL A 1996. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194.
- BOURREAU E, PRÉVOT G, GARDON J, PRADINAUD R, LAUNOIS P 2001. High Intralesional Interleukin-10 Messenger RNA Expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Unresponsiveness to Treatment. *J Infect Dis* 194: 1628-1630.
- BRASIL 2017. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*, 1st ed., Editora MS, Brasília, 189 pp.
- BRENER Z 1956. Notes on infection of rats with *Schistosoma mansoni*. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 8:565-575.
- BRODSKYN CI, BARRAL A, BOAVENTURA V, CARVALHO E, BARRAL-NETTO M 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 159: 4467-4473.
- BRUNET LR, FINKELMAN FD, CHEEVER AW, KOPF MA, PEARCE EJ 1997. IL-4 Protects Against TNF- α -Mediated Cachexia and Death During Acute Schistosomiasis. *J Immunol* 159: 777-785.

CALEGARI-SILVA TC, AVIVARINI AC, MIQUELINE M, DOS SANTOS GRRM, KARINA LUIZA TEIXEIRA KL, SALIBA AM, DE CARVALHO SN, DE CARVALHO L, LOPES UG 2015 The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF- κ B p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. *Open Biol* 5: 150118.

CALEGARI-SILVA TC, AVIVARINI AC, PEREIRA RMS, DIAS-TEIXEIRA KL, RATH CT, PACHECO ASS, SILVA GBL, PINTO CAS, DOS SANTOS JV, SALIBA AM, CORBETT CEP, GOMES CMC, LOPES UG 2018. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. *Eur J Immunol* 48: 1188-1198.

CALVOPINA M, GOMEZ EA, SINDERMANN H, COOPER PJ, HASHIGUCHI Y 2006. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1074-1077.

CAMPANELLI AP, BRODSKYN CI, BOAVENTURA V, SILVA C, ROSELINO AM, COSTA J, SALDANHA AC, DE FREITAR LAR, OLIVEIRA CI, BARRAL-NETTO M, SILVA JS, BARRAL A 2010. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Human Immunol* 71: 1220-1227.

CAÑEDA-GUZMAN IC, SALAIZA-SUAZO N, FERNANDEZ-FIGUEROA EA, CARRADA-FIGUEROA G, AGUIRRE-GARCIA M, BECKER I 2014. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: A comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS ONE* 9: e112410.

CARDOSO FO, DE SOUZA CS, MENDES VG, ABREU-SILVA AL, COSTA SCG, CALABRESE KS 2010. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis* 201:1933-1940.

CARLSEN ED, HAY C, HERNAND CA, POPOV V, GARG NJ, SOON L 2013. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Trigger Neutrophil Activation but Resist Neutrophil Microbicidal Mechanisms. *Infect Immun* 81: 3966-3974.

CARLSEN ED, LIANG Y, SHELITE TR, WALKER DH, MELBY PC, SOONG L 2015. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 182: 109-118.

- CARMO EVS, KATZ S, BARBIÉRI CL 2010. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Macrophages. PLoS One 5: e13815.
- CARNEIRO MW, FUKUTANI KF, ANDRADE BB, CURVELO RP, CRISTAL JR, CARVALHO EM, BARRAL A, COSTA JM, BITTENCOURT A, MARSDEN P 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop 56: 315-325.
- CAROD-ARTAL FJ 2008. Neurological complications of *Schistosoma* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 102: 107-116.
- CARVALHO AM, AMORIM CF, BARBOSA JLS, LAGO AS, CARVALHO EM 2015. Age Modifies the Immunologic Response and Clinical Presentation of American Tegumentary Leishmaniasis. Am J Trop Med 92: 1173-1177.
- CARVALHO AM, BARRAL A, VAN WEYENBERGH J, BARRAL-NETTO M, OLIVEIRA CI 2016. Gene Expression Profile of High IFN- γ Producers Stimulated with *Leishmania braziliensis* Identifies Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 10: e0005116.
- CASAVECHIA MTG, MELO GAN, FERNANDES ACBS, CASTRO KR, PEDROSO RB, SANTOS TS, TEIXEIRA JJV 2018. Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. Parasitology 145: 1000-1014.
- CASTELLANO LR, CORREIA FILHO D, ARGIRO L, DESSEIN H, PRATA A, DESSEIN A, RODRIGUES V 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. Hum Immunol 70: 383-390.
- CASTELLUCCI L, JAMIESON SE, ALMEIDA L, OLIVEIRA J, GUIMARÃES LH, LESSA M, FAKIOLA M, JESUS AR, MILLER EN; CARVALHO EM, BLACKWELL JM 2012. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. Infect Genet Evol 12: 1102-1110.
- CASTELLUCCI L, JAMIESON SE, MILLER EN, DE ALMEIDA LF, OLIVEIRA J, MAGALHÃES A, GUIMARÃES LH, LESSA M, LAGO E, DE JESUS AR, CARVALHO EM, BLACKWELL JM 2011. *FLII* polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. Genes Immun 12: 589-594.

CASTELLUCCI L, JAMIESON SE, MILLER EN, MENEZES E, OLIVEIRA J, MAGALHÃES A, GUIMARÃES LH, LESSA M, DE JESUS AR, CARVALHO EM, BLACKWELL JM 2010. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: A case-control and family-based study. *BMC Med Genet* 11: 10.

CASTELLUCCI L, MENEZES E, OLIVEIRA J, MAGALHÃES A, GUIMARÃES LH, LESSA M, RIBEIRO S, REALE J, NORONHA EF, WILSON ME, DUGGAL P, BEATY TH, JERONIMO S, JAMIESON SE, BALES A, BLACKWELL JM, DE JESUS AR, CARVALHO EM 2006. IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J. Infect. Dis* 194: 519-527.

CASTRO VN, RODRIGUES JL, CARDOSO DT, RESENDE SD, MAGALHÃES FC, SOUZA DC, REQUEIJO MH, NEGRÃO-CORRÊA D, GEIGER SM 2018. Systemic Cytokine and Chemokine Profiles in Individuals With *Schistosoma mansoni* Infection and Low Parasite Burden. *Front Immunol* 9: 2975.

CAVALCANTE-COSTA VS, COSTA-REGINALDO M, QUEIROZ-OLIVEIRA T, OLIVEIRA ACS, COUTO NF, DOS ANJOS DO, LIMA-SANTOS J, ANDRADE LO, HORTA MF, CASTRO-GOMES T 2019. *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. *J Cell Sci* 132: 1-16.

CELESTE JLL, MOURA APV, FRANÇA-SILVA JC, SOUSA GM, MELO MN, TAFURI WL, SOUZA CC, ANDRADE HM 2017. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology* 144: 1191-1202.

COELHO PMZ, MAYRINK W, DIAS M, PEREIRA LH 1980. Susceptibility to *Leishmania mexicana* of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *T Roy Soc Trop Med H* 74: 141.

COLLEY DG, ANDROS TS, CAMPBELL Jr CH, 2017. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? *Infect Dis Poverty* 6: 63-71.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH 2014. Human schistosomiasis. *Lancet* 383: 2253-2264.

CONCEIÇÃO-SILVA F, ALVES CR 2014. *Leishmanioses do continente americano*, 1st ed., Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 512 pp.

CONVIT J, CASTELLANOS PL, ULRICH M, CASTES M, RONDÓN A, PINARDI ME, RODRÍQUEZ N, BLOOM BR, FORMICA S, VALECILLOS L, BRETANÃ A 1989. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of american cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis 160: 104-115.

CONVIT J, PINARDI ME, RONDON AJ 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. Trans R Soc Trop Med Hyg 66: 603-610.

COOKE A, TONKS P, JONES FM, O'SHEA H, HUTCHINGS P, FULFORD AJ, DUNNE DW 1999. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Parasite Immunol 21: 169-176.

COSTA DL, CARREGARO V, LIMA-JÚNIOR DS, SILVA SM, MILANEZI CM, CARDOSO CR, GIUDICE A, DE JESUS AR, CARVALHO EM, ALMEIDA RP, SILVA JS 2011. BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of *Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. PLoS Negl Trop Dis 5: e965.

COSTA JM, MARSDEN PD, LLANOS-CUENTAS EA, NETTO EM, CARVALHO EM, BARRAL A, ROSA AC, CUBA CC, MAGALHÃES AV, BARRETO AC 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. J Trop Med Hyg 89: 319-323.

COUPPIÉ P, CLYTI E, SAINTE-MARIE D, DEDET JP, CARMÉ B, PRADINAUD R 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: Case of a patient with 425 lesions. Am J Trop Med Hyg 71: 558-560.

CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 19: 111-126.

DE REZENDE MC, ARAÚJO ES, MOREIRA JMP, RODRIGUES VF, RODRIGUES JL, PEREIRA CAJ, NEGRÃO-CORRÊA D 2015. Effect of different stages of *Schistosoma mansoni* infection on the parasite burden and immune response to *Strongyloides venezuelensis* in co-infected mice. Parasitol Res 114: 4601-4616. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. Eur J Immunol 33: 2822-2831.

DE SOUZA CSF, CALABRESE KS, ABREU-SILVA AL, CARVALHO LOP, CARDOSO FO, DORVAL MEMC, OSHIRO ET, QUARESMA PF, GONTIJO CMF, PACHECO RS, ROSSI MID, DA COSTA SCG, ZAVERUCHA DO VALLE T 2018. *Leishmania*

amazonensis isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. *Histol Histopathol* 33: 705-716.

DE VEER MJ, CURTIS JM, BALDWIN TM, DIDONATO JA, SEXTON A, MCCONVILLE MJ, HANDMAN E, SCHOFIELD L 2003.

DEAN DA, MANGOLD BL 1992. Evidence that Both Normal and Immune Elimination of *Schistosoma mansoni* take Place at the Lung Stage of Migration Prior to Parasite Death. *Am J Trop Med Hyg* 47: 238-248.

DEDET JP, RYTER A, VOGT E, HOSLI P, DA SILVA LP 1983. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. *Ann Trop Med Parasitol* 77: 35-44.

DEKREY GK, LIMA HC, TITUS RG 1998. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66: 827-829.

DIAS BRS, DE SOUZA CS, ALMEIDA NJ, LIMA JGB, FUKUTANI KF, DOS SANTOS TBS, FRANÇA-cost j, brodskyn ci, de menezes jpb, colombo mi, veras pst 2018. Autophagic Induction Greatly Enhances *Leishmania major* Intracellular Survival Compared to *Leishmania amazonensis* in CBA/j-Infected Macrophages. *Front Microbiol* 9: 1890.

DÍAS NL, ZERPA O, TAPIA FJ 2013. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 446-452.

DÍAZ NL, ARVELAEZ FA, ZERPA O, TAPIA FJ 2006. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 31, 114-117.

DUNNE DW, COOKE A 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Rev* 5: 420-426.

DUNNE DW, JONES FM, DOENHOFF MJ. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology* 103: 225-236.

DUQUE GA, DESCOTEAUX A 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5: 491.

EDWARDS JP, ZHANG X, FRAUWIRTH KA, MOSSER DM 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukocyte Biol* 80:

1298-1307.

EL RIDI, TALLIMA H, MAHANA N, DALTON JP 2010. Innate immunogenicity and in vitro protective potential of *Schistosoma mansoni* lung schistosomula excretory-secretory candidate vaccine antigens. *Microbes Infect* 12: 700-709.

ELIAS D, AKUFFO H, BRITTON S 2006. Helminthes could influence the outcome of vaccines against TB in the tropics. *Parasite Immunol* 28: 507-513.

ELIAS D, BRITTON S, KASSU A, AKUFFO H 2007. Chronic helminth infections may negatively influence immunity against tuberculosis and other diseases of public health importance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 475-484.

ELIOTT AM, KIZZA M, QUIGLEY MA, NDIBAZZA J, NAMPIJJA M, MUHANGI L, MORISON L, NAMUJU PB, MUWANGA M, KABATEREINE N, WHITWORTH J 2007. The impact of helminths on the response to immunization and on the incidence of infection and disease in childhood in Uganda: design of a randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial trial of deworming interventions delivered in pregnancy and early childhood [ISRCTN32849447]. *Clin Trials* 4: 42-57.

ERWIG LP, KLUTH DC, WALSH GM, REES AJ 1998. Initial Cytokine Exposure Determines Function of Macrophages and Renders Them Unresponsive to Other Cytokines. *J Immunol* 161: 1983-1988.

ESPINOZA-MORALES D, RODRÍGUEZ AL, SILVA-CASO W, SUAREZ-OGNIO L, PONS MJ, MENDOZA JV 2017. An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania peruviana* in the valleys of Ancash-Peru. *Asian Pac J Trop Med* 10: 1101-1103.

EVERTS B, PERONA-WRIGHT G, SMITS HH, HOKKE CH, VAN DER HAM AJ, FITZSIMMONS CM, DOENHOFF MJ, BOSCH J, MOHRS K, HAAS H, MOHRS M, YAZDANBAKHSH M, SCHRAMM G 2009. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med* 206: 1673-1680.

FALCÃO PL, CORREA-OLIVEIRA R, FRAGA LAO, TALVANI A, PROUDFOOT AEI, WELLS TNC, WILLIAMS TJ, JOSE PJ, TEIXEIRA MM 2002. Plasma Concentrations and Role of Macrophage Inflammatory Protein-1 α during Chronic *Schistosoma mansoni* Infection in Humans. *J Infect Dis* 186: 1696-1700.

FALCÃO SAC, WEINKOPFF T, HURRELL BP, CELES FS, CURVELO RP, PRATES DB,

BARRAL A, BORGES VM, TACCHINI-COTTIER, DE OLIVEIRA CI 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. PLoS Negl Trop Dis 9: e0003601.

FARIA DR, GOLLOB KJ, BARBOSA J, JR, SCHRIEFER A, MACHADO PR, LESSA H, CARVALHO LP, ROMANO-SILVA MA, DE JESUS AR, CARVALHO EM, DUTRA WO 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun 73: 7853-7859.

FARIA DR, SOUZA PE, DURAES FV, CARVALHO EM, GOLLOB KJ, MACHADO PR, DUTRA WO 2009. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol 31: 432-439.

FARIA MS, REIS FCG, LIMA APCA 2012. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? J Parasitol Res 2012: 930257.

FEIJÓ D, TIBÚRCIO R, AMPUERO M, BRODSKYN C, TAVARES N 2016. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. J Immunol Res 2016: 3967436.

FERRARI TCA 2004. Involvement of Central Nervous System in the Schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 59-62.

FILARDY AA, PIRES DR, NUNES MP, TAKIYA CM, FREIRE-DE-LIMA CG, RIBEIRO-GOMES FL, DOSREIS GA 2010. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. J Immunol 185: 2044-2055.

FITZSIMMONS CM, SCHRAMM G, JONES FM, CHALMERS IW, HOFFMANN KF, GREVELDING CG, WUHRER M, HOKKE CH, HAAS H, DOENHOFF M J, DUNNE DW 2005. Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. Mol Biochem Parasitol 144: 123–127.

FLEMING FM, BROOKER S, GEIGER SM, CALDAS IR, CORREA-OLIVEIRA R, HOTEZ PJ, BETHONY JM 2006. Synergistic associations between hookworm and otherhelminth species in a rural community in Brazil. Trop Med Int Health 11: 56-64.

FOLLADOR I, ARAÚJO C, BACELLAR O, ARAÚJO CB, CARVALHO LP, ALMEIDA RP, CARVALHO EM 2002. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical

Form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis 34: e54-58.

FORESTIER C, MACHU C, LOUSSERT C, PESCHER P, SPÄTH GF 2011. Imaging Host Cell-*Leishmania* Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. Cell Host Microbe 9: 319-330.

FRANCA-COSTA J, WEYENBERGH JV, BOAVENTURA VS, LUZ NF, MALTA-SANTOS H, OLIVEIRA MCS, CAMPOS DCS, SALDANHA AC, DOS-SANTOS WLC, BOZZA PT, BARRAL-NETTO M, BARRAL A, COSTA JM, BORGES VM 2015. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis 211: 426–435.

FRIDLENDER ZG, SUN J, KIM S, KAPOOR V, CHENG G, LING L, WORTHEN GS, ALBELDA SM 2010. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. Cancer Cell 16: 183-194.

GALANTI SE, HUANG SC, PEARCE EJ 2012. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis 6: e1509.

GARCÍA-HERNÁNDEZ R, MANZANO JI, CASTANYS S, GAMARRO F 2012. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. PLoS Negl Trop Dis 6: e1974.

GAZE ST, DUTRA WO, LESSA M, LESSA H, GUIMARÃES LH, JESUS AR, CARVALHO LP, MACHADO P, CARVALHO EM, GOLLOB KJ 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. Scand J Immunol 63: 70-78.

GHOSH D, STUMHOFER JS 2013. Do you see what I see: Recognition of protozoan parasites by Toll-like receptors. Curr Immunol Rev 9: 129-140.

GHOSH EEB, CASSADO AA, GOVONI GR, FUKUHARA T, YANG Y, MONACK DM, BORTOLUCI KR, ALMEIDA SR, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA 2010. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. P Natl Acad Sci 107: 2568-2573.

GIRAUD E, LESTINOVA T, DERRICK T, OIHANE M, DILLON RJ, VOLF P, MÜLLER I, BATES PA, ROGERS ME 2018. *Leishmania* proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. PLoS Pathog 14: e1006794.

- GIUDICE A, VENDRAME C, BEZERRA C, CARVALHO LP, DEVALECHIA T, CARVALHO EM, BACELLAR O 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect Dis 12: 75.
- GOBERT GN, TRAN MH, MOERTEL L, MULVENNA J, JONES MK, MCMANUS DP, LOUKAS A 2010. Transcriptional Changes in *Schistosoma mansoni* during Early Schistosomula Development and in the Presence of Erythrocytes. PLoS Neglect Trop D 4: e600.
- GREEN SJ, CRAWFORD RM, HOCKMEYER JT, MELTZER MS, NACY CA 1990. *Leishmania major* AMASTIGOTES INITIATE THE L-ARGININE-DEPENDENT KILLING MECHANISM IN IFN- γ -STIMULATED MACROPHAGES BY INDUCTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR- α . J Immunol 145: 4290-4297.
- GRIMALDI G, JR, SOARES MJ, MORIEARTY PL 1984. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol 6:397-408.
- GRYSEELS G 2012. Schistosomiasis. Infect Dis Clin N Am 26: 383-397.
- GUERRA CS, SILVA RMM, CARVALHO LOP, CALABRESE KS, BOZZA PT, CÔRTE-REAL S 2010. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. Int J Exp Pathol 91: 451-459.
- GUIMARÃES-COSTA AB, NASCIMENTO MT, FROMENT GS, SOARES RP, MORGADO FN, CONCEIÇÃO-SILVA F, SARAIVA EM 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci USA 106: 6748-6753.
- GURUNG P, KANNEGANTI T 2015. Innate immunity against *Leishmania* infections. Cell Microbiol 17: 1286-1294.
- HAAS W, GRABE K, GEIS C, PÄCH T, STOLL K, FUCHS M, HABERL B, LOY C 2002. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. Parasitol 124: 153-167.
- HAEBERLEIN S, OBIEGLO K, OZIR-FAZALALIKHAN A, CHAYE AM, VENINGA H, VAN DER VLUGT L, VOSKAMP A, BOON L, DEN HAAN JMM, WESTERHOF LB, WILBERS RHP, SCHOTS A, SCHRAMM G, HOOKE CH, SMITS HH 2017. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory

B cells. PLoS Pathog 13: e1006539.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? Front Immunol 4: 89-97.

HASHIGUCHI Y, GOMEZ EL, KATO H, MARTINI LR, VELEZ LN, UEZATO H 2016. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. Trop Med Health 44: 2.

HE Y, SALAFSKY B, RAMASWAMY K 2005. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. TRENDS Parasitol 21: 201-203.

HERBERT DR, HÖLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M, LEETO M, KIRSCH R, HALL P, MOSSMANN H, CLAUSSEN B, FÖRSTER I, BROMBACHER F 2001. Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. Immunology 20: 623-635.

HERVÉ M, ANGELI V, PINZAR E, WINTJENS R, FAVEEUW C, NARUMIYA S, CAPRON A, URADE Y, CAPRON M, RIVEAU G, TROTTEIN F 2003. Pivotal roles of the parasite PGD synthase 2 and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. Eur J Immunol 33: 2764–2772.

HESSE M, MODOLELL M, LA FLAMME AC, SCHITO M, FUENTES JM, CHEEVER AW, PEARCE EJ, WYNN TA 2001. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. J Immunol 167: 6533-6544.

HESSE M, PICCIRILLO CA, BELKAID Y, PRUFER J, MENTINK-KANE M, LEUSINK M, CHEEVER AW, SHEVACH EM, WYNN TA 2004. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. J Immunol 172: 3157-3166.

HOCKLEY DJ, MCLAREN DJ 1973. *SCHISTOSOMA MANSONI*: CHANGES IN THE OUTER MEMBRANE OF THE TEGUMENT DURING DEVELOPMENT FROM CERCARIA TO ADULT WORM. Int J Parasitol 3: 13-25.

HOFFMANN KF, CHEEVER AW, WYNN TA 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.

HÜRLIMANN E, HOUNGBEDJI CA, YAPI RB, N'DRI PB, SILUÉ KD, OUATTARA M, UTZINGER J, N'GORAN EK, RASO G 2019. Antagonistic effects of *Plasmodium*-helminth coinfections on malaria pathology in different population groups in Côte d'Ivoire. PLoS Negl Trop Dis 13: e0007086.

INIESTA V, GÓMEZ-NIETO LC, CORRALIZA I 2001. The Inhibition of Arginase by N^{ω} -Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of *Leishmania* Inside Macrophages. J Exp Med 193: 777-784.

INIESTA V, GÓMEZ-NIETO LC, MOLANO I, MOHEDANO A, CARCELÉN J, MIRÓN C, ALONSO C, CORRALIZA I 2002. Arginase I in macrophages mediates *Leishmania* growth Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. Parasite Immunol 24: 113-118.

JAMES SL, COOK KW, LAZDINS JK 1990. ACTIVATION OF HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES TO KILL SCHISTOSOMULA OF *Schistosoma mansoni* IN VITRO. J Immunol 145: 2686-2690.

JEREMIAS WJ, ARAÚJO FMG, QUEIROZ FR, PAIS FSM, DE MATTOS ACA, SALIM ACM, COELHO PMZ, OLIVEIRA GC, KUSSEL JR, GUERRA-SÁ R, COIMBRA RS, BABÁ EH 2017. Comparative sequence analysis reveals regulation of gene in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni* exposed to host portal serum. PLoS One 12: e0178829.

JI J, MASTERSON J, SUN J, SOONG L 2005. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. J Immunol 174: 7147-7153.

JI J, SUN J, SOONG L 2003. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. Infect Immun 71: 4278-4288.

JONES DE, ACKERMANN MR, WILLE U, HUNTER CA, SCOTT P 2002. Early Enhanced Th1 Response after *Leishmania amazonensis* Infection of C57BL/6 Interleukin-10-Deficient Mice Does Not Lead to Resolution of Infection. Infect Immun 70: 2151-2158.

JONES DE, BUXBAUM LU, SCOTT P 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 165: 364-372.

JONES TC, JOHNSON WD, JR., BARRETTO AC, LAGO E, BADARO R, CERF B, REED SG, NETTO EM, TADA MS, FRANCA TF, WIESE K, GOLIGHTLY L, FIKRIG E, COSTA JML, CUBA CC, MARSDEN PD 1987. Epidemiology of american cutaneous

leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. J Infect Dis 156: 73-83.

JOSHI AD, RAYMOND T, COELHO AL, KUNKEL SL, HOGABOAM CM 2008. A systemic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs alters responsiveness of bone marrow-derived macrophages to Toll-like receptor agonists. J Leukocyte Biol 83: 314-324.

JÜTTNER S, BERNHAGEN J, METZ CN, RÖLLINGHOFF M, BUCALA R, GESSNER A 1998. Migration Inhibitory Factor Induces Killing of *Leishmania major* by Macrophages: Dependence on Reactive Nitrogen Intermediates and Endogenous TNF- α . J Immunol 161: 2383-2390.

KATZ N 2018. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. 22nd ed. Belo Horizonte: CPqRR, 76 p.

KHAYEKA-WANDABWA C, KUTIMA HL, NYAMBATI VCS, INGONGA J, OYOO-OKOTH E, KARANI LW, JUMBA B, GITHUKU KS, ANJILI CO 2013. Combination therapy using Pentostam and Praziquantel improves lesion healing and parasite resolution in BALB/c mice co-infected with *Leishmania major* and *Schistosoma mansoni*. Parasit Vectors 6: 244-254.

KLEIN SL 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. Neurosci Biobehav Rev 6: 627-638.

KROPF P, FREUDENBERG N, KALIS C, MODOLELL M, HERATH S, GALANOS C, FREUDENBERG M, MÜLLER I 2004. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. J Leukocyte Biol 76: 48-57.

LA FLAMME AC, RUDDENKLAU K, BACKSTROM BT 2003. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immunol 71: 4996-5004.

LA FLAMME AC, SCOTT P, PEARCE EJ 2002. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. Parasite Immunol 24: 339-345.

LACORCIA M, DA COSTA CUP 2018. Maternal Schistosomiasis: Immunomodulatory Effects With Lasting Impact on Allergies and Vaccine Response. Front Immunol 9: 2960.

LANG R, SCHICK J 2017. Review: impact of Helminth infection on Antimycobacterial immunity—A Focus on the Macrophage. Front Immunol 8: 1864-1874.

- LAOUAR Y, SUTTERWALA FS, GORELIK L, FLAVELL RA 2005. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 6: 600-607.
- LAWYER PG, NGUMBI PM, ANJILI CO, ODONGO SO, MEBRAHTU YB, GITHURE JI, KOECH DK, ROBERTS CR 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 43: 31-43.
- LAYLAND LE, RAD R, WAGNER H, DA COSTA CU 2007. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur J Immunol* 37:2174-84.
- LEOPOLDO PT, MACHADO PR, ALMEIDA RP, SCHRIEFER A, GIUDICE A, DE JESUS AR, HO JL, GUIMARÃES LH, BACELLAR O, CARVALHO EM 2006. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* 6: 75.
- LESSA HA, MACHADO P, LIMA F, CRUZ AA, BACELLAR O, GUERREIRO J, CARVALHO EM 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65: 87-89.
- LEUTNER S, OLIVEIRA KC, ROTTER B, BECKMANN S, BURO C, HAHNEL S, KITAJIMA JP, VERJOVSKI-ALMEIDA S, WINTER P, GREVELDING CG 2013. Combinatory microarray and SuperSAGE analyses identify pairing-dependently transcribed genes in *Schistosoma mansoni* males, including follistatin. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2532.
- LIEW FY, LI Y, MILLOTT S 1990. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306-4310.
- LIEW FY, LI Y, MOSS D, PARKINSON C, ROGERS MV, MONCADA S 1991. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol* 21: 3009-3014.
- LIMA MHF, SACRAMENTO LA, QUIRINO GFS, FERREIRA MD, BENEVIDES L, SANTANA AKM, CUNHA FQ, ALMEIDA RP, SILVA JS, CARREGARO V 2017. *Leishmania infantum* Parasites Subvert the Host Inflammatory Response through the Adenosine A2A Receptor to Promote the Establishment of Infection. *Front Immunol* 8: 815.
- LIMA-JUNIOR DS, COSTA DL, CARREGARO V, CUNHA LD, SILVA ALN, MINEO TWP, GUTIERREZ FR, BELLIO M, BORTOLUCI KR, FLAVELL RA, BOZZA MT,

SILVA JS, ZAMBONI DS 2013. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxidied-mediated resistance to *Leishmania*. Nat Med 19: 909-915.

LIU D, UZONNA JE 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Front Cell Infect Microbiol 2: 83.

LOPES DM, FERNANDES JS, CARDOSO TMS, BAFICA AMB, OLIVEIRA SC, CARVALHO EM, ARAUJO MI, CARDOSO LS 2014. Dendritic Cell Profile Induced by *Schistosoma mansoni* Antigen in Cutaneous Leishmaniasis Patients. Biomed Res Int 2014: 1-11.

LOPES DM, ALMEIDA TVVS, SOUZA RP, RIBEIRO LEV, PAGE B, FERNANDES JS, CARVALHO EM, CARDOSO LS 2018. Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by *Leishmania braziliensis*. Mol Immunol 93: 173-183.

LOPES DM, OLIVEIRA SC, PAGE B, CARVALHO LP, CARVALHO EM, CARDOSO LS 2019. *Schistosoma mansoni* Sm29 Antigen Induces a Regulatory Phenotype on Dendritic Cells and Lymphocytes From Patients With Cutaneous Leishmaniasis. Front Immunol 9: 3122.

LUTZ MB, STROBL H, SCHULER G, ROMANI N 2017. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. Front Immunol 8: 1388.

LYKE KE, DICKO A, DABOA, SANGARE L, KONE A, COULIBALY D, GUINDO A, TRAORE K, DAOU M, DIARRA I, SZTEIN MB, PLOWE CV, DOUMBO OK 2005. ASSOCIATION OF *SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM* INFECTION WITH PROTECTION AGAINST ACUTE *PLASMODIUM FALCIPARUM* MALARIA IN MALIAN CHILDREN. Am J Trop Med Hyg 73: 1124-1130.

MACHADO PR, ROSA ME, COSTA D, MIGNAC M, SILVA JS, SCHRIEFER A, TEIXEIRA MM, BACELLAR O, CARVALHO EM 2011. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. Trans R Soc Trop Med Hyg 105: 438-444.

MACHADO-COELHO GL, CAIAFFA WT, GENARO O, MAGALHÃES PA, MAYRINK W 2005. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 99: 55-61.

MCMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, XIAO-

- NONG ZHOU XN 2018. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 4: 13.
- MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS Immunol* 25: 677-686.
- MAROLI M, FELICIANGELI MD, BICHAUD L, CHARREL RN, GRADONI L 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 27: 123-147.
- MARTINELLI ALC 2004. HIPERTENSÃO PORTAL. *Medicina* 37: 253-261.
- MARTINEZ FO, GORDON S 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13.
- MARTINS-MELO FR, CARNEIRO M, RAMOS JR AN, HEUKELBACH J, RIBEIRO ALP, WERNECK GL 2018. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006559.
- MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF 1994. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ* 10: 359-375.
- MATSUOKA T, HIRATA M, TANAKA H, TAKAHASHI Y, MURATA T, KABASHIMA K, SUGIMOTO Y, KOBAYASHI T, USHIKUBI F, AZE Y, EGUCHI N, URADE Y, YOSHIDA N, KIMURA K, MIZOGUCHI A, HONDA Y, NAGAI H, NARUMIYA S. 2000. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 287: 2013-2017.
- MATTE C, OLIVIER M 2002. *Leishmania*-Induced Cellular Recruitment during the Early Inflammatory Response: Modulation of Proinflammatory Mediators. *J Infect Dis* 185: 673-681.
- MAYER JU, DEMIRI M, AGACE WM, MACDONALD AS, SVENSSON-FREJ M, MILLING SW 2017. Different populations of CD11b⁺ dendritic cells drive Th2 responses in the small intestine and colon. *Nat Commun* 8: 15820.
- MCMAHON-PRATT D, ALEXANDER J 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 201: 206-224.
- MEIRELES CB, MAIA LC, SOARES GC, TEODORO IPP, GADELHA MSV, SILVA

CGL, LIMA MAP 2017. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop* 172: 240-254.

MENEZES-SOUZA D, GUERRA-SÁ R, CARNEIRO CM, VITORIANO-SOUZA J, GIUNCHETTI RC, TEIXEIRA-CARVALHO A, SILVEIRA-LEMOS D, OLIVEIRA GC, CORRÊA-OLIVEIRA R, REIS AB 2012. Higher Expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 Chemokines in the Skin Associated with Parasite Density in Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1566.

MENSON EN, WILSON RA 1989. Lung-phase immunity to *Schistosoma mansoni*. Flow cytometric analysis of macrophage activation states in vaccinated mice. *J Immunol* 143: 2342-2348.

MIRANDA GS 2018. *ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR Schistosoma mansoni EM PACIENTES COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA E COM HISTÓRICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA*, MSc Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144 pp.

MOTRAN CC, SILVANE L, CHIAPELLO LS, THEUMER MG, AMBROSIO LF, VOLPINI X, CELIAS DP, CERVI L 2018. Helminth infections: Recognition and Modulation of the immune Response by innate immune Cells. *Front Immunol* 9: 664.

MUKBEL RM, PATTEN JR C, GIBSON K, GHOSH M, PETERSEN C, JONES DG 2007. MACROPHAGE KILLING OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS* AMASTIGOTES REQUIRES BOTH NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE. *Am J Trop Med Hyg* 76: 669-675.

MUKHERJEE S, KARMAKAR S, BABU SPS 2016. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis* 20: 193-204.

MUXEL SM, ACUÑA SM, AOKI JI, ZAMPIERI RA, FLOETER-WINTER LM 2018B. Toll-Like Receptor and miRNA-let-7e Expression Alter the Inflammatory Response in *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages. *Front Immunol* 9: 2792.

MUXEL SM, AOKI JI, FERNANDES JCR, LARANJEIRA-SILVA MF, ZAMPIERI RA, ACUÑA SM, MÜLLER KE, VANDERLINDE RH, FLOETER-WINTER LM 2018a. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. *Front Microbiol* 8: 2682.

NASCIMENTO MSL, ALBUQUERQUE TDR, DO-VALLE-MATTA MA, CALDAS IS, DINIZ LF, TALVANI A, BAHIA MT, ANDRADE CM, GALVÃO LMC, CÂMARA ACJ, GUEDES PMM 2013. *Vet Immunol Immunop* 153: 202-208.

NATHAN C 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173-182.

NEWLOVE T, GUIMARÃES LH, MORGAN DJ, ALCÂNTARA L, GLESBY MJ, CARVALHO EM, MACHADO PR 2011. Antihelminthic Therapy and Antimony in Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Patients Co-Infected with Helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 84: 551-555.

NOBEN-TRAUTH N, LIRA R, NAGASE H, PAUL WE, SACKS DL (2003). The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol* 170: 5152–5158.

NOVAIS FO & SCOTT P 2015. CD8⁺ T cells in cutaneous leishmaniasis: The good, the bad and the ugly. *Semin Immunopathol* 37: 251-259.

NOVAIS FO, CARVALHO LP, GRAFF JW, BEITING DP, RUTHEL G, ROOS DR, BETTS MR, GOLDSCHMIDT MH, WILSON ME, OLIVEIRA CI, SCOTT P 2013. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathog* 9: e1003504.

O'NEAL SE, GUIMARÃES LH, MACHADO PR, ALCÂNTARA L, MORGAN DJ, PASSOS S, GLEBSY MJ, CARVALHO EM 2007. Influence of Helminth Infections on the Clinical Course of and Immune Response to *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 142-148.

OKANO M, NISHIZAKI K, ABE M, WANG MM, YOSHINO T, SATOSKAR AR, MASUDA Y, HARN JR DA 1999b. Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy* 54: 593-601.

OKANO M, SATOSKAR AR, NISHIZAKI K, ABE M, HARN JR DA 1999a. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163: 6712-6717.

OKANO M, SATOSKAR AR, NISHIZAKI K, HARN JR DA 2001. Lacto-*N*-fucopentaose III Found on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Functions as Adjuvant for Proteins by Inducing Th2-Type Response. *J Immunol* 167: 442-450.

OLIVEIRA CI, BRODSKY CI 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol* 3: 1-9.

OLIVEIRA F, BAFICA A, ROSATO AB, FAVALI CBF, COSTA JM, CAFE V, BARRAL-

NETTO M, BARRAL A 2011. Short Report: Lesion Size Correlates with *Leishmania* Antigen-Stimulated TNF-Levels in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-73.

OLIVEIRA SC, FIGUEIREDO BC, CARDOSO LS, CARVALHO EM 2016. A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. *Mucosal Immunol* 9: 1366-1371.

OLIVEIRA WJ, MAGALHÃES FC, ELIAS AMS, CASTRO VN, FAVERO V, LINDHOLZ CG, OLIVEIRA AA, BARBOSA FS, GIL F, GOMES MA, GRAEFF-TEIXEIRA C, ENK MJ, COELHO PMZ, CARNEIRO M, NEGRÃO-CORRÊA DA, GEIGER SM 2018. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006232.

OLIVEIRA WN, RIBEIRO LE, SCHRIEFFER A, MACHADO P, CARVALHO EM, BACELLAR O 2014. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* 66: 127-132.

OSMAN A, NILES EG, VERJOVSKI-ALMEIDA S, LOVERDE PT 2006. *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog* 2: e54.

OSORIO LE, CASTILLO CM, OCHOA MT 1998. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: Clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 59: 49-52.

PADIGEL UM, ALEXANDER J, FARRELL JP 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171: 3705–3710.

PEARCE EJ, KANE CM, SUN J, TAYLOR JJ, MCKEE AS, CERVI L 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201: 117-126.

PEARCE EJ, MACDONALD AS 2002. THE IMMUNOBIOLOGY OF SCHISTOSOMIASIS. *Nat Rev Immunol* 2: 499-511.

PEARSON RD, SOUSA AQ 1996. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 22: 1-13.

PELLEGRINO J, MACEDO DG 1955. A simplified method for the concentration of

cercariae. J Parasit 41: 329–330.

PEREIRA CG, SILVA ALN, CASTILHOS P, MASTRANTONIO EC, SOUZA RA, ROMÃO RP, REZENDE RJ, PENA JDO, BELETTI ME, SOUZA MA 2009b. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. Vet Parasitol 165: 231-240.

PEREIRA LI, DORTA ML, PEREIRA AJ, BASTOS RP, OLIVEIRA MA, PINTO SA, GALDINO H ,JR, MAYRINK W, BARCELOS W, TOLEDO VP, LIMA GM, RIBEIRO-DIAS F 2009a. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. Am J Trop Med Hyg 81: 378-383.

PEREIRA LOR, MOREIRA RB, OLIVEIRA MP, REIS SO, NETO MPO, PIRMEZ C 2017. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? Int J Infect Dis 57: 132-137.

PETERS NC, EGEN JG, SECUNDINO N, DEBRABANT A, KIMBLIN N, KAMHAWI S, LAWYER P, FAY MP, GERMAIN RN, SACKS D 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 321: 970-974.

PETERSEN EA, NEVA FA, OSTER CN, DIAZ HB 1982. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. N Engl J Med 306: 387-392.

PETRITUS PM, Manzoni-de-Almeida D, Gimblet C, Gonzalez Lombana C, Scott P 2012. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. PLoS Negl Trop Dis 6: e1858.

PIGOTT DM, GOLDING N, MESSINA JP, BATTLE KE, DUDA KA, BALARD Y, BASTIEN P, PARTLONG F, BROWNSTEIN JS, FREIFELD CC, MEKARU RK, MADOFF LC, GEORGE DB, MYERS MF, HAY SI 2014. Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960-2012. eLife 3: e02851.

POLARI LP, CARNEIRO PP, MACEDO M, MACHADO PRL, SCOTT P, CARVALHO EM, BACELLAR O 2019. *Leishmania braziliensis* Infection Enhances Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and Triggers TNF- α and IL-10 Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. Front Cell Infect Mi 9: 120.

POMPEU MM, BRODSKYN C, TEIXEIRA MJ, CLARÊNCIO J, VAN WEYENBERGH

- J, COELHO IC, CARDOSO SA, BARRAL A, BARRAL-NETTO M 2001. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect Immun* 69: 7453-7460.
- PONTE-SUCRE A, GAMARRO F, DUJARDIN J-C, BARRETT MP, LÓPEZ-VÉLEZ R, GARCÍA-HERNÁNDEZ R, POUTAIN AW, MWENECHANYA R, PAPADOPOULOU B 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0006052.
- PRAJEETH CK, HAEBERLEIN S, SEBALD H, SCHLEICHER U, BOGDAN C 2011. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect Immun* 79: 2699-2708.
- RATH M, MÜLLER I, KROPF P, CLOSS EL, MUNDER M 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 5: 532.
- REDENTE EF, ORLICKY DJ, BOUCHARD RJ, MALKINSON AM 2007. Tumor Signaling to the Bone Marrow Changes the Phenotype of Monocytes and Pulmonary Macrophages during Urethane-Induced Primary Lung Tumorigenesis in A/J Mice. *Am J Pathol* 170: 693-708.
- REGLI IB, PASSELLI K, HURRELL BP, TACCHINI-COTTIER F 2017. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to escape neutrophil Killing. *Front Immunol* 8: 1558.
- REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
- RESENDE SD, MAGALHÃES FC, RODRIGUES-OLIVEIRA JL, CASTRO VN, SOUZA CSA, OLIVEIRA EJ, CARNEIRO M, GEIGER SM, NEGRÃO-CORRÊA DA 2019. Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- α and High Levels of IL-10 in Serum. *Front Immunol* 9: e3158.
- REYNOLDS SR, HARN DA 1992. Comparison of Irradiated-Cercaria Schistosome Vaccine Models That Use 15- and 50-Kilorad Doses: the 15-Kilorad Dose Gives Greater Protection, Smaller Liver Sizes, and Higher Gamma Interferon Levels after Challenge. *Infect Immun* 60: 90-94.
- RICHTER J, CORREIA DACAL AR, VERGETTI SIQUEIRA JG, POGGENSEE G,

- MANN SMANN U, DEELDER A, FELDMEIER H 1998. Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. Trop Med Int Health 3: 728–735.
- RITTER U, FRISCHKNECHT F, VAN ZANDBERGEN G 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? Cell Press 25: 505-510.
- RITTER U, MOLL H, LASKAY T, BRÖCKER EB, VELAZCO O, BECKER I, GILLITZER R 1996. Differential Expression of Chemokines in Patients with Localized and Diffuse Cutaneous American Leishmaniasis. J Infect Dis 173: 699-709.
- RITTIG MG, BOGDAN C 2000. *Leishmania*–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. Parasitol Today 16: 292-297.
- ROCHA MN, CORRÊA CM, MELO MN, BEVERLEY SM, MARTINS-FILHO OA, MADUREIRA AP, SOARES RP 2013. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. Diagn Micr Infec Dis 75: 282-291.
- RODRIGUES JPF, CALDAS IS, GONÇALVES RV, ALMEIDA LA, SOUZA RLM, NOVAES RD 2017. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. Nitric Oxide 66: 43-52.
- ROGERS ME 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. Front Microbiol 3: 1-13.
- ROGERS ME, HAMJOVÁ M, JOSHI MB, SADLOVA J, DWYER DM, VOLF P, BATES PA 2008. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cell Microbiol 10: 1363-1372.
- ROMA EH, MACEDO JP, GOES GR, GONÇALVES JL, CASTRO W, CISALPINO D, VIEIRA LQ 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. Parasite Vector 9: 193.
- ROMANO A, CARNEIRO MBH, DORIA NA, ROMA EH, RIBEIRO-GOMES FL, INBAR E, LEE SH, MENDEZ J, PAUN A, SACKS DL, PETERS NC 2017. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. PLoS Pathog 13: e1006479.
- ROSS AG, MCMANUS DP, FARRAR J, HUNSTMAN RJ, GRAY DJ, LI YS 2012. Neuroschistosomiasis. J Neurol 259: 22-32.

ROSS AG, VICKERS D, OLDS GR, SHAH SM, MCMANUS DP 2007. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis* 7: 218–24.

SACKS D, NOBEN-THRAUT N 2002. THE IMMUNOLOGY OF SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO *LEISHMANIA MAJOR* IN MICE. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858.

SALAIZA-SUAZO N, VOLKOW P, TAMAYO R, MOLL H, GILLITZER, R, PÉREZ-TORRES A, PÉREZ-MONTFORT R, DOMINGUEZ JD, VELASCO-CASTREJON O, CRIPPA M, BECKER I 1999. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop. Med. Int. Health* 4: 801-811.

SANTIAGO HC, OLIVEIRA CF, SANTIAGO L, FERRAZ FO, DE SOUZA DG, DE-FREITAS LAR, AFONSO LCC, TEIXEIRA MM, GAZZINELLI RT, VIEIRA LQ 2004. Involvement of the Chemokine RANTES (CCL5) in Resistance to Experimental Infection with *Leishmania major*. *Infect Immun* 72: 4918-4923.

SANTRICH C, SEGURA I, ARIAS AL, SARAVIA NG 1990. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg* 42: 51-55.

SCHAIBLE UE, SCHLESINGER PH, STEINBERG TH, MANGEL WF, KOBAYASHI T, RUSSELL DG 1999. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J Cell Sci* 112: 681-693.

SCHOFIELD L, GRAU GE 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722-735.

SCHRIEFER A, WILSON ME, CARVALHO EM 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 21: 483-488.

SCHUBACH A, HADDAD F, NETO MPO, DEGRAVE W, PIRMEZ C, GRIMALDI G, FERNANDES O 1998a. Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. *J Infect Dis* 178: 911-914.

SCHUBACH A, MARZOCHI MCA, CUZZI-MAYA T, OLIVEIRA AV, ARAUJO ML, OLIVEIRA ALC, PACHECO RS, MOMEN H, CONCEIÇÃO-SILVA F, COUTINHO SG, MARZOCHI KBF 1998b. CUTANEOUS SCARS IN AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS PATIENTS: A SITE OF *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* PERSISTENCE AND VIABILITY ELEVEN YEARS AFTER ANTIMONIAL THERAPY

- AND CLINICAL CURE. *Am J Trop Med Hyg* 58: 824-827.
- SCHWARTS C, FALLON PG 2018. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol* 9: 2492.
- SCHWARTS C, OESER K, DA COSTA CP, LAYLAND LE, VOEHRINGER D 2014. T Cell-Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils. *J Immunol* 193: 3590-3599.
- SCHWARTZ E 2002. Pulmonary schistosomiasis. *Clin Chest Med* 23: 433-443.
- SCHWARZ T, REMER KA, NAHRENDORF W, MASIC A, SIEWE L, MÜLLER W, ROERS A, MOLL H 2013. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. *PLoS Pathog* 9: e1003476.
- SCORZA BM, CARVALHO EM, WILSON ME 2017. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 18: e1296.
- SCOTT P, NOVAIS FO 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune response in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 16: 581-592.
- SEBLOVA V, SADLOVA J, VOJTKOVA B, VOTYPKA J, CARPENTER S, BATES PA, VOLF P 2015. The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004060.
- SEIFERT K, ESCOBAR P, CROFT SL 2010. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65: 508-511.
- SELYE H 1953. Induction of topical resistance to acute tissue injury: an experimental study with the granuloma pouch technique. *Surg Clin North Am* 97: 1417-1446.
- SERAFIM TD, COUTINHO-ABREU IV, OLIVEIRA F, MENESES C, KAMHAWI S, VALENZUELA JG 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol* 5: 548-555.
- SIBLEY LD 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240: 72-91.
- SOKHNA C, HESRAN JYL, MBAYE PA, AKIANA J, CAMARA P, DIOP M, LY A, DRUILHE P 2004. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J* 3: 43-48.

SOUSA AQ, PARISE ME, POMPEU MM, COELHO FILHO JM, VASCONCELOS IA, LIMA JW, OLIVEIRA EG, VASCONCELOS AW, DAVID JR, MAGUIRE JH 1995. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. Am J Trop Med Hyg 53: 380-385.

SOUSA LM, CARNEIRO MB, RESENDE ME, MARTINS LS, DOS SANTOS LM, VAZ LG, MELLO PS, MOSSER DM, OLIVEIRA MA, VIEIRA LQ 2014. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. Parasite Immunol 36: 13-31.

SOUZA VCA, MOURA DMN, DE CASTRO MCAB, BOZZA PT, PAIVA LA, FERNANDES CJB, LEÃO RLC, LUCENA JP, DE ARAÚJO RE, SILVA AJM, FIGUEIREDO RCBQ, OLIVEIRA SA 2019. Adoptive transfer of Bone Marrow- Derived Monocytes Ameliorates *Schistosoma mansoni* -Induced Liver Fibrosis in Mice. Sci Rep 9: 6434.

SOUZA VL, VERAS PST, WELBY-BORGES M, SILVA TMC, LEITE BR, FERRARO RB, MEYER-FERNANDES JR, BARRAL A, COSTA JML, DE FREITAS LAR 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBa mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 106: 23-31.

STOUT RD, JIANG C, MATTA B, TIETZEL I, WATKINS SK, SUTTLES J 2005. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. J Immunol 175: 342-349.

STRAUBINGER K, PAUL S, COSTA OP, RITTER M, BUCH T, BUSCH DH, LAYLAND LE, DA COSTA CUP 2014. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol 134: 1271-1279.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J 2015. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. Expert Opin Pharmacother 16: 237-252.

TAVARES NM, ARAÚJO-SANTOS T, AFONSO L, NOGUEIRA PM, LOPES UG, SOARES RP, BOZZA PT, BANDEIRA-MELO C, BORGES VM, BRODSKYN C 2014. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. J Infect Dis 210: 656-666.

TAYLOR JJ, MOHRS M, PEARCE EJ 2006. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector

Population. *J Immunol* 176: 5839-5847.

TEIXEIRA MJ, FERNANDES JD, TEIXEIRA CR, ANDRADE BB, POMPEU ML, SILVA JS, BRODSKYN CI, BARRAL-NETTO M, BARRAL A 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* Isolates Induce Different Paces of Chemokine Expression Patterns. *Infect Immunol* 73: 1191-1195.

TEIXEIRA MJ, TEIXEIRA CR, ANDRADE BB, BARRAL-NETTO M, BARRAL A 2006. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *TREND Parasitol* 22: 32-40.

THOMAS PG, CARTER MR, ATOCHINA O, DA'DARA AA, PISKORSKA D, MCGUIRE E, HARN DA 2003. Maturation of Dendritic Cell 2 Phenotype by a Helminth Glycan Uses a Toll-Like Receptor 4-Dependent Mechanism. *J Immunol* 171: 5837-5841.

TOLOUEI S, HEJAZI SH, GHAEDI K, KHAMESIPOUR A, HASHEMINIA SJ 2013. TLR2 and TLR4 in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *Scand J Immunol* 78: 478-484.

TOULZA F, ELIAOU JF, PINET V 2005. Breast tumor cell soluble factors induce monocytes to produce angiogenic but not angiostatic CXC chemokines. *Int J Cancer* 115: 429-436.

TSIKAS D 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research, *J Chromatogr B* 15: 51-70.

TURETZ ML, MACHADO PR, KO AI, ALVES F, BITTENCOURT A, ALMEIDA RP, MOBASHERY N, JOHNSON WD, JR, CARVALHO EM 2002. Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186: 1829-1834.

TURNER JD, JENKINS GR, HOGG KG, AYNSLEY SA, PAVELEY RA, COOK PC, COLES MC, MOUNTFORD AP 2011. CD4⁺CD25⁺ Regulatory Cells Contribute to the Regulation of Colonic Th2 Granulomatous Pathology Caused by Schistosome Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1269.

TURNER JD, NARANG P, COLES MC, MOUNTFORD AP 2012. Blood Flukes Exploit Peyer's Patch Lymphoid Tissue to Facilitate Transmission from the Mammalian Host. *PLoS Pathog* 8: e1003063.

UNGER A, O'NEAL S, MACHADO PR, GUIMARÃES LH, MORGAN DJ, SCHRIEFER A, BACELLAR O, GLESBY MJ, CARVALHO EM 2009. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in

- northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574-579.
- VAN ZANDBERGEN G, KLINGER M, MUELLER A, DANNENBERG S, GEBERT A, SOLBACH W, LASKAY T 2004. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J Immunol* 173: 6521-6525.
- VELASCO O, SAVARINO SJ, WALTON BC, GAM AA, NEVA FA 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 41: 280-288.
- WAKIL AE, WANG ZE, RYAN JC, FOWELL DJ, LOCKSLEY RM 1998. Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J Exp Med* 188: 1651-1656.
- WATANABE Y, HAMAGUCHI-TSURU E, MORIMOTO N, NISHIO Y, YAGYU K, KONISHI Y, TOMINAGA M, MIYAZAKI JI, FURUYA M, TOMINAGA A 2004. IL-5-Induced eosinophils suppress the growth of *Leishmania amazonensis* in vivo and kill promastigotes in vitro in response to either IL-4 or IFN-gamma. *DNA Cell Biol* 23: 412-418.
- WEERAKOON KGAD, GOBERT GN, CAI P, MCMANUS DP 2015. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 28: 939-967.
- WEINSTOCK JV, BOROS DL 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 130: 418-422.
- WHITE RR, ARTAVANIS-TSAKONAS K 2012. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence* 3: 668-677.
- WILSON J, HUYNH C, KENNEDY KA, WARD DM, KAPLAN J, ADEREM A, ANDREWS NW 2008. Control of Parasitophorous Vacuole Expansion by LYST/Beige Restricts the Intracellular Growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog* 4: e1000179.
- WILSON RA 2009. The saga of schistosome migration and attrition. *Parasitology* 136: 1581-1592.
- WILSON RA, DRASKAU T, MILLER P, LAWSON JR 1978. *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitology* 77: 57-73.
- WOLMARANS CT, DE KOCK KN, STRAUSS HD, BORNMAN M 2002. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *J Helminthol* 76: 273-277.

WOOD LJ, INMAN MD, WATSON RM, FOLEY R, DENBURG JA, O'BYRNE PM 1998. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 99-105

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2015. *Water, Sanitation & Hygiene for accelerating and sustaining progress on Neglected Tropical Diseases*, Geneva, 31 pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2016a. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 22: 287-296.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2016b. : Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2018a. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2018b. Global leishmaniasis surveillance update, 1998-2016. *Wkly Epidemiol Rec* 40: 530-540.

WYNN TA, BARRON L 2010. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30:245-257.

YOLE DS, SHAMALA KT, KITHOME K, GICHERU MM 2007. Studies on the interaction of *Schistosoma mansoni* and *Leishmania major* in experimentally infected Balb/c mice. *Afr J Health Sci* 14: 80-85.

YOSHIDA A, MARUYAMA H, YABU Y, AMANO T, KOBAYAKAWA T, OHTA N 1999. Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Int* 48: 73-79.

ZACCONE P, BURTON O, MILLER N, JONES FM, DUNNE DW, COOKE A 2009. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol* 39: 1098-1107.

ZERPA O, ULRICH M, BLANCO B, POLEGRE M, AVILA A, MATOS N, MENDOZA I, PRATLONG F, RAVEL C, CONVIT J 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol* 156: 1328-1335.

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 398/2018

Título do projeto: Efeito da co-infecção por *Schistosoma mansoni* e por *Leishmania* na susceptibilidade, resposta imune e morbidade do hospedeiro

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Deborah Aparecida Negrao Correa

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2023

Belo Horizonte, 25/02/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br